

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 3, Number 321 (2017), 141 – 145

A. O. Abekova^{1,2}, G. V. Volodina², R. A. Islamov²,
Zh. S. Abramova², R. T. Kenzhebekova², A. I. Ilin²

¹Al-Farabi Kazakh national university, Almaty, Kazakhstan,

²Scientific Center for Anti-Infectious Drugs, Almaty, Kazakhstan

E-mail: renatislamov@gmail.com

PECULIARITIES OF DETERMINING *IN VITRO* CYTOTOXICITY OF IODINE COORDINATION COMPOUND

Abstract. The widely used linear methods for determining *in vitro* toxicity of substances do not always give adequate results. This is influenced by the structure and properties of the substances being studied. Various results were obtained when determining the cytotoxic effect of the iodine coordination compound by the Reed and Muench method, pair regression, and Hill four-parameter logistic function. At the same time, the mean cytotoxic concentrations of the control substance (sodium lauryl sulfate) affecting human mononuclear cells and calculated by the three methods did not differ. This is due to the fact that the linear interpolation method is based on estimating a narrow segment of the concentration range. Other parts of the concentration-effect curve are not analyzed. Therefore, when studying cytotoxicity, it is necessary to control whether the tested substance has a classic dose-effect relationship. If the graphical cytotoxicity of substances does not have a standard dose-effect form, then other nonlinear models, for example, the Hill model, should be used.

Keywords: iodine coordination compound, cytotoxicity, median effective concentration, dose-effect.

УДК 57.085.23+615.27+546.15

A. O. Абекова^{1,2}, Г. В. Володина², Р. А. Исламов²,
Ж. С. Абрамова², Р. Т. Кенжебекова², А. И. Ильин²

¹РГП «Казахский национальный университет им. аль-Фараби», Алматы, Казахстан,

²АО «Научный центр противоиных препаратов», Алматы, Казахстан

ОСОБЕННОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ КООРДИНАЦИОННОГО СОЕДИНЕНИЯ ИОДА *IN VITRO*

Аннотация. Широко используемые линейные методы определения токсичности веществ *in vitro* не всегда дают адекватные результаты. На это оказывают влияние структура и свойства исследуемых веществ. Так, при определении цитотоксического действия координационного соединения иода методами Рида и Менча, парной регрессии и четырехпараметровой логистической функцией Хилла были получены различные результаты. В то время как средние цитотоксические концентрации контрольного вещества лаурилсульфата натрия, воздействующие на мононуклеарные клетки человека, рассчитанные тремя методами, не различались. Это связано с тем, что в основе метода линейной интерполяции лежит оценка узкого отрезка диапазона концентраций. Другие части кривой зависимости эффекта от концентрации вещества не анализируются. Поэтому при изучении цитотоксичности необходимо проверять имеет ли исследуемое вещество классическую зависимость «доза – эффект». Если графическая цитотоксичность веществ не имеет стандартную форму «доза – эффект», то следует использовать другие, нелинейные модели, например Хилла.

Ключевые слова: координационное соединение иода, цитотоксичность, средняя эффективная концентрация, доза – эффект.

Введение. Изучение цитотоксичности является одним из важнейших этапов раннего доклинического испытания безопасности любого нового химического соединения. В ходе исследования изучается механизм и характер цитотоксической активности, оценивается диапазон цитотоксических концентраций, появляется возможность прогнозировать токсические дозы для лабораторных животных [1, 2]. Отдельным аспектом этих исследований является изучение цитотоксичности антибластных лекарственных средств [3]. Наибольшую трудность в оценке цитотоксичности представляет метод расчёта концентраций. Эти сложности связаны с характером повреждающего действия вещества на клетки. Если вещество характеризуется прямым цитотоксическим действием, является стабильным в биологической среде организма и описывается характерной сигмоидной кривой, то большинство методов расчета параметров «доза – эффект» будут давать относительно схожие результаты [4, 5]. В тех случаях, когда исследуемое вещество не будет соответствовать какому-либо из условий, то следует ожидать несколько парадоксальную картину (биомодальная кривая) цитотоксического действия, когда токсичность может возрасти до некоторого предела, а затем убывать, что особенно важно в противоопухолевой терапии [6]. Среди таких веществ следует отметить некоторые лекарственные препараты, обладающие противоопухолевой активностью [7]. Среди перспективных антибластных препаратов, индуцирующих апоптотическую гибель опухолевых клеток, следует отметить координационные соединения иода. Иод, имея большой ионный радиус в сравнении с другими галогенами и сильную поляризуемость электронной оболочки, способен образовывать разнообразнейшие комплексы с лигандами различной химической природы. Проявляя донорно-акцепторные свойства, иод позволяет синтезировать координационные соединения с управляемой биологической активностью [8-11]. Это могут быть антибактериальная, противовирусная, иммуномодулирующая, антиоксидантная или противоопухолевая активности [12-15]. Поэтому химическое разнообразие координационных соединений иода предполагает их различное проявление биологической активности и токсичности.

Целью работы являлось изучение цитотоксичности координационного соединения иода различными методами оценки зависимости «доза – эффект».

Материалы и методы

Исследуемое вещество – координационное соединение (аддукт) иода с галогенидами щелочных металлов, полипептидами и карбогидратами (КС) [16]. Положительным контролем являлась натриевая соль лаурилсерной кислоты (ЛСН) (AppliChem, Германия).

Клетки. В качестве объектов исследования были использованы клеточные линии: MDCK, K-562 (ATCC CCL-243) и моноклеарная фракция крови человека (МНК). Клетки выращивали на среде RPMI-1640 (Sigma, США), содержащей 10 % ФБС (Sigma, США) и 0,32 мг/мл глутамин (Sigma, США) (полная питательная среда) при 37 °С и 5 %-ном содержании CO₂ в атмосфере.

МНК выделяли из донорской крови здорового человека без хронических заболеваний. К крови добавляли полиглокин (6 % декстран) для осаждения эритроцитов. Надосадочную жидкость отмывали, ресуспендировали и фракционировали на градиенте плотности гистобака (Sigma, США), соответствующего плавучей плотности человеческих МНК ($\rho = 1,076$ г/мл) при 4 °С и 3000 об/мин в течение 20 мин. Фракцию МНК отмывали центрифугированием и ресуспендировали в культуральной среде RPMI-1640 (Sigma, США). Процент жизнеспособных клеток оценивали при помощи включения трипанового синего (Sigma, США). Во всех экспериментах использовали суспензии с процентом жизнеспособных клеток больше 90 %.

МТТ-тест. Клетки рассеивали в концентрации 100 тыс кл/яч на 96-луночные плашки (BRAND plates, Германия) и инкубировали с различными концентрациями исследуемых веществ (50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56, 0,78, 0,4, 0,2, 0,1, 0,05, 0,025, 0,012, 0,006 и 0,003 мг/мл) в течение 48 часов в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °С, 5 % CO₂ и 95 % влажности. Негативным контролем служили ячейки с клетками без веществ. После окончания инкубации в каждую лунку вносили по 20 мкл МТТ-реагента (Sigma, США) (5 мг/мл) и инкубировали еще 4 часа при 37 °С. Для растворения формазана в каждую лунку добавляли по 100 мкл ДМСО. Фотометрическое измерение оптической плотности среды (ОП) производили на микропланшетном ридере Sunrise Tecan на длине волны 540 нм. Концентрацию препарата, уменьшающую значение оптической плотности на 50 % по сравнению с контролем клеток, принимали за 50 % цитотоксическую концентрацию (ЦТК₅₀).

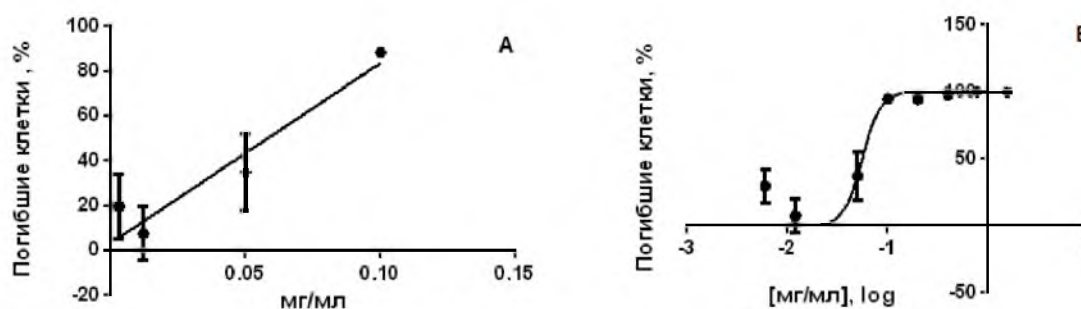
Методы оценки зависимости «доза-эффект». Цитотоксическую активность веществ изучали следующими методами оценки зависимости «доза-эффект»: по Риду и Менча (линейная интерполяция); методом простой (парной) линейной регрессии в программе GraphPad Prism 6; методом четырехпараметровой логистической функции Хилла (нелинейная регрессия) в программе GraphPad Prism 6.

Статистические методы. Все исследования проводили в трех повторностях. Достоверность различий между экспериментальными данными оценивали при помощи критерия Стьюдента. Значения уровня достоверности $P > 0,05$ считали несущественными.

Результаты и их обсуждение

Часто, для описания зависимости «доза – эффект», применяют методы Бернса, пробит-анализ, Рида и Менча, и т.д. Однако все они имеют как преимущества, так и недостатки. Поэтому обосновано критикуются в литературе, а их использование сильно ограничено качеством получаемых экспериментальных результатов, и особенно в исследованиях *in vitro* [4, 5]. В настоящее время в фармакологии и токсикологии применяются другие модели описания влияния веществ на клетку, в которые положена модель лиганд – рецепторного взаимодействия. Если представить ее в виде графика, то получается гиперболическая зависимость эффекта от концентрации вещества. Эта зависимость описывается известным уравнением Хилла, выводимое из закона действующих масс [17]. Следует отметить, что существует аналогичное уравнение Михаэлиса–Ментен, которое выражает количественное соотношение между концентрацией субстрата и скоростью ферментативной реакции, но с той лишь разницей, что не включает коэффициент Хилла (n) характеризующий наклон кривой E/s [17]. Однако, из линейной формы обоих уравнений невозможно точно определить некоторые параметры, поэтому прибегают к их преобразованию. Так, для уравнения Хилла, это построение графика в полулогарифмическом масштабе. В результате получается классическая зависимость «доза – эффект» в виде сигмоидной кривой.

В работе оценку воздействия исследуемых веществ на клеточные линии MDCK, K-562 и МНК крови человека проводили тремя методами – Рида и Менча, линейной и нелинейной регрессией. На рисунке представлены кривые зависимости эффекта от изучаемых концентраций ЛСН, выбранного в качестве контрольного вещества. Выбор ЛСН связан с прямым токсическим действием на мембрану клетки и классической зависимостью «доза – эффект» [18].



Кривые «доза – эффект» для ЛСН в культуре МНК:
А – метод линейной регрессии, Б – метод нелинейной регрессии

При построении модели линейной регрессии для ЛСН (рисунок А) отбрасывали нулевые и максимальные значения, при которых кривая выходила на «плато». Таким образом, был выбран участок кривой между 1 и 90 % эффекта. При этом член уравнения a линейной регрессии (т.е. Y при $X = 0$) должен быть малым при максимальном количестве точек. Этот подход позволяет более полно проанализировать кривую «доза – эффект», а не выбирать две подходящие точки, как того требует метод Рида-Менча [5]. Тем самым уменьшается ошибка в расчёте ЦТК₅₀, находимой линейной интерполяцией. Кроме того, этот подход очень прост, не требует дополнительных условий к равенности интервалов между дозами и может быть воспроизведен в Excel. Хотя и он относится к грубым методам оценки средних эффективных концентраций [19]. Считается, что

многопараметровые модели, описывающие биологические эффекты, являются более реалистичными [20]. Построенная логистическая кривая «доза – эффект» для ЛСН на мононуклеарных клетках имеет стандартную, сигмоидную форму (рисунок Б). Для сравнения полученных результатов провели расчёт ЦТК₅₀ для контрольного вещества ЛСН и КС по трем методам (таблица).

Средние цитотоксические концентрации ЛСН и КС рассчитанные различными методами

Клеточные линии	Линейная интерполяция	Линейная регрессия	Нелинейная регрессия
ЛСН, мг/мл			
МНК	0,06 ± 0,01	0,09 ± 0,02	0,05 ± 0,02
КС, мг/мл			
MDCK	9,51 ± 0,84	11,91 ± 0,41 *	4,48 ± 1,02**
К-562	5,01 ± 0,58	12,23 ± 6,59	4,37 ± 0,71
МНК	0,69 ± 0,19	5,87 ± 2,72	0,45 ± 0,16**
* Достоверность различий между методами Рида и Менча и линейной регрессии по Стьюденту: $p \leq 0,05$;			
** Достоверность различий между методами Рида и Менча и нелинейной регрессии по Стьюденту: $p \leq 0,05$.			

Средние эффективные концентрации ЛСН на МНК, рассчитанные всеми тремя методами не различались. Поскольку зависимость «доза – эффект» даже в линейной форме имела стандартный вид. Чего нельзя сказать о координационном соединении иода, поскольку такие соединения обладают как цитотоксической, так и антиоксидантной активностью, в зависимости от концентрации [8]. Поэтому наблюдается двукратное снижение цитотоксичности в диапазоне 12–50 мкг/мл, а затем опять рост до 100 % гибели мононуклеарных клеток.

Экспериментально показано селективное цитотоксическое действие координационного соединения иода на различные клеточные линии. Линейная регрессия давала завышенные значения ЦТК₅₀. Это обуславливается исключением из расчётов минимальных и максимальных значений эффекта, которые положены в основу логистического уравнения Хилла [21]. Однако наблюдается достоверная разница и между методами Рида-Менча и нелинейной регрессией.

Таким образом, при оценке цитотоксической активности КС иода необходимо учитывать в расчётах весь диапазон концентраций, включая участок кривой с парадоксальной реакцией. Чего не позволяют линейные методы – Рида и Менча и простой (парной) линейной регрессии.

REFERENCES

- [1] Riss TL, Moravec RA, Niles AL. (2011) Cytotoxicity testing: measuring viable cells, dead cells, and detecting mechanism of cell death, *Methods Mol Biol*, 740:103-114. DOI: 10.1007/978-1-61779-108-6-12.
- [2] OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 129. (2010) Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests. Paris, OECD.
- [3] Colombo P, Gunnarsson K, Iatropoulos M, Brughera M. (2001) Toxicological testing of cytotoxic drugs (review), *Int J Oncol*, 19:1021-1028. DOI: 10.3892/ijo.19.5.1021.
- [4] Gad SC (2000) *In vitro toxicology*, second edition. Taylor and Francis, N.-Y. ISBN:1560327693.
- [5] Krishtopenko SV, Tihov MS, Popova YeB. (2008) Dose – effect. Moscow, Meditsina Pub., 288. ISBN: 5-255-03979-0.
- [6] Bellagamba BC, de Abreu BRR, Grivicich I, Markarian CF, Chem E, Camassola M, Nardi NB, Dihl RR. (2016) Human mesenchymal stem cells are resistant to cytotoxic and genotoxic effects of cisplatin in vitro, *Genetics and Molecular Biology*, 39:129-134. DOI: 10.1590/1678-4685-GMB-2015-0057.
- [7] Pickard RD, Spencer BH, McFarland AJ, Bernaitis N, Davey AK, Perkins AV, Chess-Williams R, McDermott CM, Forbes A, Christie D, Anoopkumar-Dukie S. (2015) Paradoxical effects of the autophagy inhibitor 3-methyladenine on docetaxel-induced toxicity in PC-3 and LNCaP prostate cancer cells, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 388:793-799. DOI: 10.1007/s00210-015-1104-7.
- [8] Küpper FC, Feiters MC, Olofsson B, Kaiho T, Yanagida S, Zimmermann MB, Carpenter LJ, Luther GW 3rd, Lu Z, Jonsson M, Kloos L. (2011) Commemorating two centuries of iodine research: an interdisciplinary overview of current research, *Angew Chem Int Ed Engl*, 50:11598-11620. DOI: 10.1002/anie.201100028.
- [9] Mahmoud KR, Refat MS, Sharshar T, Adam MA, Manaaa El-SA. (2016) Synthesis of amino acid iodine charge transfer complexes in situ methanolic medium: Chemical and physical investigations, *J Mol Liq*, 222:1061-1067. DOI: 10.1016/j.molliq.2016.07.138.

- [10] Yuldasheva GA, Zhidomirov GM, Leszczynski J, Ilin AI. (2013) The effect of the amphoteric properties of amino acids in the zwitterionic form on the structure of iodine complex compounds in aqueous solutions containing halogenides of alkaline metals and amino acids, *Journal of Molecular Structure*, 1033:321-330.
- [11] Solanki GK, Amin A, Padhiyar A, Ray AK, Oza AT. (2008) Polaron hopping in some biomolecular solids and their charge transfer complexes, *Indian J Biochem Biophys*, 45:421-429.
- [12] Reimer K, Wichelhaus TA, Schäfer V, Rudolph P, Kramer A, Wutzler P, Ganzer D, Fleischer W. (2002) Antimicrobial effectiveness of povidone-iodine and consequences for new application areas, *Dermatology*, 204:114-120.
- [13] Ohtani T, Mizuashi M, Ito Y, Aiba S. (2007) Cadexomer as well as cadexomer iodine induces the production of proinflammatory cytokines and vascular endothelial growth factor by human macrophages, *Exp Dermatol*, 16:318-323. DOI: 10.1111/j.1600-0625.2006.00532.x.
- [14] Aceves C, García-Solís P, Arroyo-Helguera O, Vega-Riveroll L, Delgado G, Anguiano B. (2009) Antineoplastic effect of iodine in mammary cancer: participation of 6-iodolactone (6-IL) and peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR), *Molecular Cancer*, 8:33. DOI:10.1186/1476-4598-8-33.
- [15] Yuldasheva GA, Zhidomirov GM, Abekova AO, Ilin AI. (2016). The Mechanism of anti-cancer activity of complexes of molecular iodine with alfa-dextrins and polypeptides and lithium halogenides, *J Antivir Antiretrovir*, 8:072-078. DOI:10.4172/jaa.1000138.
- [16] Ilin AI, Kulmanov ME. Antibacterial agent for treating infectious diseases of bacterial origin. Patent 389 US 2014/0010782 A1 — 2014-09-03.
- [17] Gesztelyi R, Zsuga J, Kemeny-Beke A, Varga B, Juhasz B, Tosaki A. (2012) The Hill equation and the origin of quantitative pharmacology, *Arch Hist Exact Sci*, 66:427-438. DOI: 10.1007/s00407-012-0098-5.
- [18] Vieira OV, Hartmann DO, Cardoso CMP, Oberdoerfer D, Baptista M, Santos MAS, Almeida L, Ramalho-Santos J, Vaz WLC. (2008) Surfactants as microbicides and contraceptive agents: a systematic in vitro study, *PLoS ONE*, 3: e2913. DOI:10.1371/journal.pone.0002913.
- [19] Rath S, Sahu MC, Dubey D, Debata NK, Padhy RN. (2011) Which value should be used as the lethal concentration 50 (LC(50)) with bacteria? *Interdiscip Sci*, 2:138-143. DOI: 10.1007/s12539-011-0081-x.
- [20] Lyles RH, Poindexter C, Evans A, Brown M, Cooper CR. (2008) Nonlinear model-based estimates of IC50 for studies involving continuous therapeutic dose-response data, *Contemporary Clinical Trials*, 29: 878-886. DOI: 10.1016/j.cct.2008.05.009.
- [21] Volpe DA, Hamed SS, Zhang LK. (2014) Use of different parameters and equations for calculation of IC₅₀ values in efflux assays: potential sources of variability in IC₅₀ determination, *AAPS J*, 1:172-180. DOI: 10.1208/s12248-013-9554-9557.

**А. О. Абекова^{1,2}, Ф. В. Володина², Р. А. Исламов²,
Ж. С. Абрамова², Р. Т. Кенжебекова², А. И. Ильин²**

¹Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Алматы, Қазақстан,

²Инфекцияға қарсы препараттардың ғылыми орталығы, Алматы, Қазақстан

IN VITRO ҮЙЛЕСІМДІ ИОД ҚОСЫНДЫСЫНЫҢ ЦИТОУЫТТЫЛЫҒЫН АНЫҚТАУ ЕРЕКШЕЛІКТЕРІ

Аннотация. *In vitro* заттарының уыттылығын анықтауда кең қолданылатын сызықтық тәсілдер әр кезде дәлме-дәл нәтижелер бере бермейді. Бұған зерттелетін заттардың қасиеті мен құрылымы ықпал етеді. Рид пен Менч тәсілдерімен үйлесімді иод қосындысына цитоуыттылық әрекетті анықтау кезінде, булы регрессия және Хилл төрттік өлшемдегі логистикалық функциясында әртүрлі нәтижелер алынды. Натрий лаурисульфатының орта ретті цитоуытты шоғыры бақыланған кезде, моноклеарлы адам жасушасына үштік тәсілмен есептелген әрекеті ажыратылған жоқ. Бұл сызықты интерполяция тәсілі негізінде, шоғырлық ауқымды тар бағалау жатыр дегенмен байланысты деген сөз. Шоғырдың қисық әсеріне басқа бөліктің бағыныңқы болуы талданбайды. Сондықтан цитоуыттылықты зерттеу кезінде зерттелетін заттың «доза – әсері» – классикалық бағыныштылығын тексеру қажеттілігін білу керек. Егер заттың кескіндік цитоуыттылығы «доза – әсері» қалыпты нұсқасы болмаса, онда басқа, сызықтық тәсілдерді, мысалы Хиллді пайдалану керек.

Түйін сөздер: иодтың үйлесімді қосындысы, цитоуыттылық, орта әсерлі шоғыр, доза – әсері.