

УДК 57.021;576.08

Исследование токсичности каликс[4]- и [6]-аренов и их сульфатированных производных в двумерной и трехмерной культуре клеточной линии колоректальной аденокарциномы

© 2020 А.В. РАЗУМОВСКАЯ^{1,2}, С.В. НИКУЛИН^{1,3*}, Б.Я. АЛЕКСЕЕВ³, А.Н. ГОРБУНОВ², И.М. ВАЦУРО², В.В. КОВАЛЕВ², А.А. ПОЛОЗНИКОВ^{1,3}

¹ Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», Москва, 101000

² Химический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991

³ ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Обнинск, 249036

*e-mail: snikulin@hse.ru

Поступила в редакцию 06.11.2020 г.

Принята к публикации 16.02.2021 г.

Проведено сравнительное исследование токсичности двух незамещенных каликсаренов, состоящих из 4 и 6 фенольных фрагментов, а также их *n*-сульфатированных производных на клеточной линии HT-29 колоректальной аденокарциномы, культивируемой в двумерном (2D) и трехмерном (3D) форматах. Показано, что незамещенные каликсарены снижают жизнеспособность опухолевых клеток, причем каликс[4]арен проявлял цитостатический эффект, а каликс[6]арен — цитотоксический. Сульфопроизводные каликсаренов не оказывали выраженного токсического действия на клетки HT-29, однако, благодаря высокой гидрофильности и способности к образованию аддуктов с различными терапевтическими молекулами, могут быть использованы для повышения эффективности доставки противоопухолевых препаратов.

Ключевые слова: каликсарены, цитотоксичность, клетки HT-29, двумерная клеточная культура, трехмерная клеточная культура

doi: 10.21519/0234-2758-2021-37-1-87-94

По данным ВОЗ, злокачественные опухоли ежегодно диагностируют у более 10 млн. человек во всем мире, при этом уровень смертности от онкологических заболеваний уступает лишь показателям болезней сердечно-сосудистой системы [1]. В связи с этим поиск новых противоопухолевых препаратов, а также соединений, повышающих биодоступность уже применяющихся для терапии соединений, относится к одной из важнейших задач современной медицинской органической химии. Каликсарены — соединения, которые считают перспективными для применения в онкотерапии.

Каликс[*n*]арены (Сх-*n*) представляют собой циклические олигомеры (рис. 1), состоящие из *n* фенольных фрагментов, связанных метиленовыми мостиками [2]. В исследовании по конденсации *n*-замещенных фенолов с формальдегидом

показано, что циклические олигомеры образуются с высокими выходами при использовании в качестве исходного соединения *n*-трет-бутилфенола [3]. На сегодняшний день известно, что некоторые каликсарены обладают противоопухолевой активностью [4–6]. Кроме того, каликсарены можно конъюгировать с терапевтическими молекулами и использовать для их доставки [7–9].

Каликсарены выгодно отличает возможность их селективной модификации как верхнего, так и нижнего обода, отсутствие токсических реагентов, используемых при их синтезе, и, как следствие, отсутствие опасных примесей в целевых соединениях [10]. С введением полярных групп в молекулы каликсаренов открывается возможность синтеза амфифильных макроциклов, которые способны к самосборке в мицеллы и везикулы, используемые для транспорта лекарственных

Список сокращений: Сх-4 – каликс[4]арен; Сх-6 – каликс[6]арен; Sc-4 – *n*-сульфокаликс[4]арен; Sc-6 – *n*-сульфокаликс[6]арен.

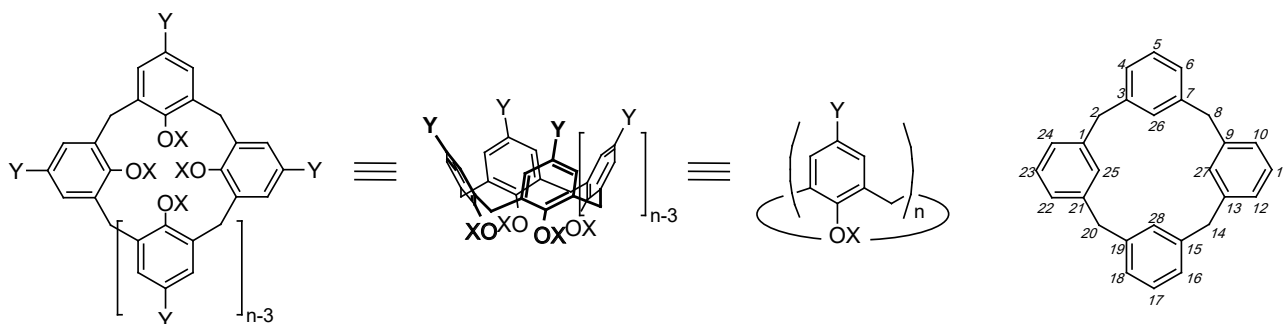


Рис. 1. Структура каликсаренов в двумерном и трехмерном форматах и нумерация атомов в каликс[4]арене.

Fig. 1. The structure of calixarenes in two- and three-dimensional formats and the numbering of atoms in the calix[4]arene.

препаратов [11], а также к включению в фосфолипидный бислой липосом, что обеспечивает нековалентную функционализацию их поверхности для направленной доставки и визуализации флуоресценции (флуоресцентный зонд) при детектировании [12]. Функциональные группы, такие как карбоксильные, фосфатные, аммониевые или сульфогруппы, могут быть селективно введены в макроциклическую платформу каликсаренов при использовании реакций с хорошими выходами [11, 13]. Синтез *n*-сульфокаликс[*n*]аренов (Sc-*n*, *n* = 4–8), хорошо растворимых в воде, впервые проведен в 1984 году и тогда же детально изучены особенности их строения и возможности образования различных комплексов включения [14]. Строение *n*-сульфокаликс[4]арена имеет форму усеченного конуса с гидрофильными верхним и нижним ободами, разделенными гидрофобной ароматической полостью, поэтому это соединение обладает свойствами биполярного амфифила [15]. Более того, недавно показано, что на нижний обод сульфокаликс[4]аренов можно вводить практически любые функциональные группы в условиях катализируемого медью (I) присоединения азидов к алкинам [16].

Преимущество использования водорастворимых каликсаренов состоит в том, что они обеспечивают гидрофобную среду (полость) для включения лекарственного средства и содержат при этом гидрофильную головку с сульфатными группами, которые обеспечивают его солюбилизацию [17, 18]. Кроме того, высокие константы устойчивости комплексов Sc-*n* с различными лекарственными средствами, разнообразие размеров внутренней полости (ее диаметр равен 3,0, 7,6 и 11,7 Å для SC-4, SC-6 и SC-8 соответственно) [19, 20], а также конформационная подвижность молекул каликсаренов — это те факторы, благодаря которым их применение как транспортеров лекарственных средств гораздо более перспективно, чем других макроциклических соединений, таких как циклодекстрины и кукурбитурилы [20, 21].

Sc-*n* также могут способствовать самоагрегации ароматических или амфифильных молекул, снижая критическую концентрацию агрегации, повышая стабильность и компактность агрегатов и регулируя степень их упорядоченности [22]. В настоящее время сульфопроизводные каликс[*n*]аренов используют для получения супраамфифилов, которые представляют фундаментальный интерес как системы доставки лекарственных препаратов разного типа [22]: цисплатина [23], иматиниба [24], 3-фенил-1Н-[1]-бензофуор-[3,2-с]-пиразола [25] и доксорубицина [26].

Наконец, важнейшая характеристика Sc-*n* — это биосовместимость. Так, SC-4 не вызывает гемолиз при концентрациях до 5 мМ и неспецифических иммунных реакций; не проникает через гематоэнцефалический барьер, не попадает в мышцы и быстро выводится из организма с мочой [27]. Значительного поглощения SC-4 в органах, особенно в печени и селезенке, также не зарегистрировано, хотя при более высоких дозах замечено его накопление в легких [27].

Цель представленной работы — исследование токсичности незамещенных и сульфатированных каликсареновых макроциклов, представляющих интерес при создании новых тераностических агентов, а также для улучшения солюбилизации и доставки уже известных противоопухолевых препаратов для диагностики и терапии онкологических заболеваний.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Реагенты

В работе использованы следующие материалы: культуральные флаконы с площадью поверхности 25 см², 24- и 96-луночные планшеты (TPP, Швейцария); культуральная среда McCoy's 5A Medium, эмбриональная сыворотка крупного рогатого скота (FBS), раствор пенициллина (10000 мг/мл) и стрептомицина (10000 мкг/мл), TrypLE (Gibco, США); трипсин–ЭДТА (0,25%) с солями Хенкса,

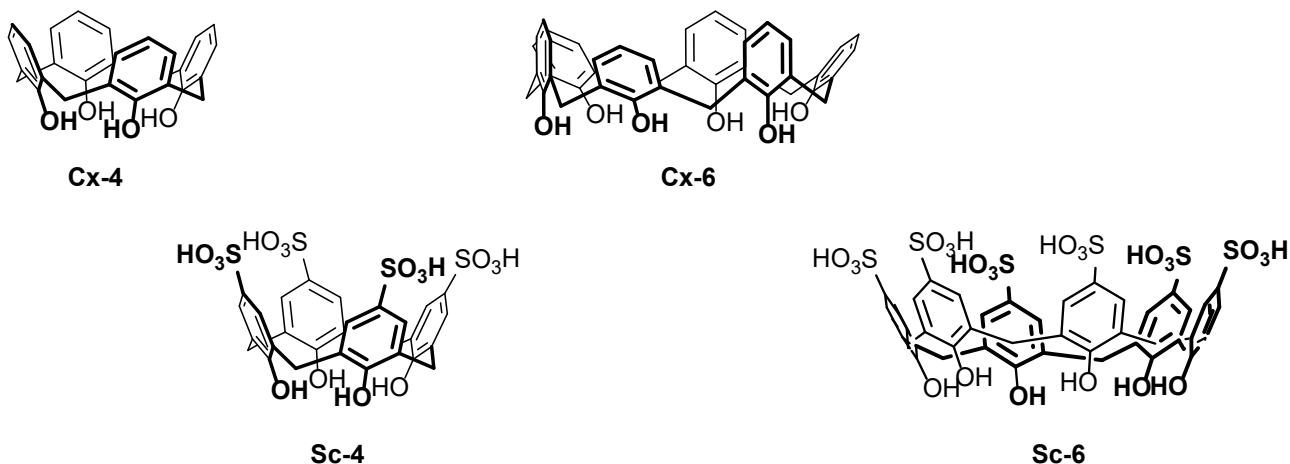


Рис. 2. Структурные формулы каликсаренов Cx-4 и Cx-6 и их сульфатированных производных Sc-4 и Sc-6.

Fig. 2. Structures of calixarenes Cx-4 and Cx-6 and their sulfated derivatives Sc-4 and Sc-6.

фосфатно-солевой буфер Dulbecco («PanEco», Россия); матригель (Corning, США); трис(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфопенил)-2Н-тетразол (MTS; #G3580, Promega, США). Каликс[4]арен (Cx-4) и каликс[6]арен (Cx-6) [28], а также *n*-сульфокаликс[4]арен (Sc-4) и *n*-сульфокаликс[6]арен (Sc-6) [29] были синтезированы по указанным методикам.

Культивирование клеток колоректальной аденокарциномы HT-29

Клетки HT-29 культивировали в среде McCoy 5A, содержащей 10 об.% FBS и по 1 об.% растворов пенициллина и стрептомицина. Культивирование проводили при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Субкультивирование повторяли каждые 2–3 сут. Трехмерное культивирование выполняли по описанной ранее методике [30]. Гистологический анализ трехмерных культур проводили, как описано ранее [31].

Оценка жизнеспособности клеток

Относительное число жизнеспособных опухолевых клеток определяли с помощью набора для MTS-анализа клеточной пролиферации CellTiter 96® AQueous One Solution (Promega) в соответствии с рекомендациями производителя. При анализе биологической активности Cx-4 и Cx-6 растворяли в ДМСО, а их сульфопроизводные, Sc-4 и Sc-6, — в воде. Полученные концентрированные растворы разводили в питательной среде до следующих концентраций: 100, 40, 16, 6,4, 1,024, 0,410, 0,164 и 0,066 мкМ. Концентрация ДМСО при этом не превышала 0,5 об.%. Клетки инкубировали с препаратами в течение 72 ч, после чего питательную среду заменяли на свежую и помещали планшеты в клеточный инкубатор на 1 ч. Оптическую плотность измеряли

на планшетном спектрофотометре X-mark (Bio-Rad, США) при длине волны 490 нм. В качестве отрицательного контроля использовали чистый ДМСО (концентрация 0,5 об.%), а в качестве положительного — 0,5%-ный раствор Tween-20.

Эксперимент проводили в трех повторах. Жизнеспособность клеток определяли по следующей формуле:

$$Vi = (As - Apc) / (Anc - Apc) \cdot 100\%$$

где Vi — жизнеспособность клеток; As, Apc и Anc — средние значения оптической плотности для лунок, содержащих испытуемое соединение, положительный контроль (лунки, содержащие Tween-20) и отрицательный контроль (лунки, содержащие только ДМСО) соответственно.

Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили с использованием языка программирования R 3.5 с интегрированной средой разработки RStudio 1.1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В работе изучен токсический эффект синтезированных каликсаренов Cx-4 и Cx-6 и их сульфопроизводных Sc-4 и Sc-6 на клетки аденокарциномы толстой кишки HT-29. Эксперименты проводили, как на обычных двумерных, 2D, культурах клеток, так и на более физиологически релевантных 3D-моделях. Известно, что 3D-культуры могут более адекватно воспроизводить структуру опухоли и лекарственную устойчивость за счет образования плотных контактов и меньшей площади поверхности [32]. Для получения трехмерных культур проводили инокуляцию клеток в матрикс Matrigel. В течение 24 ч после

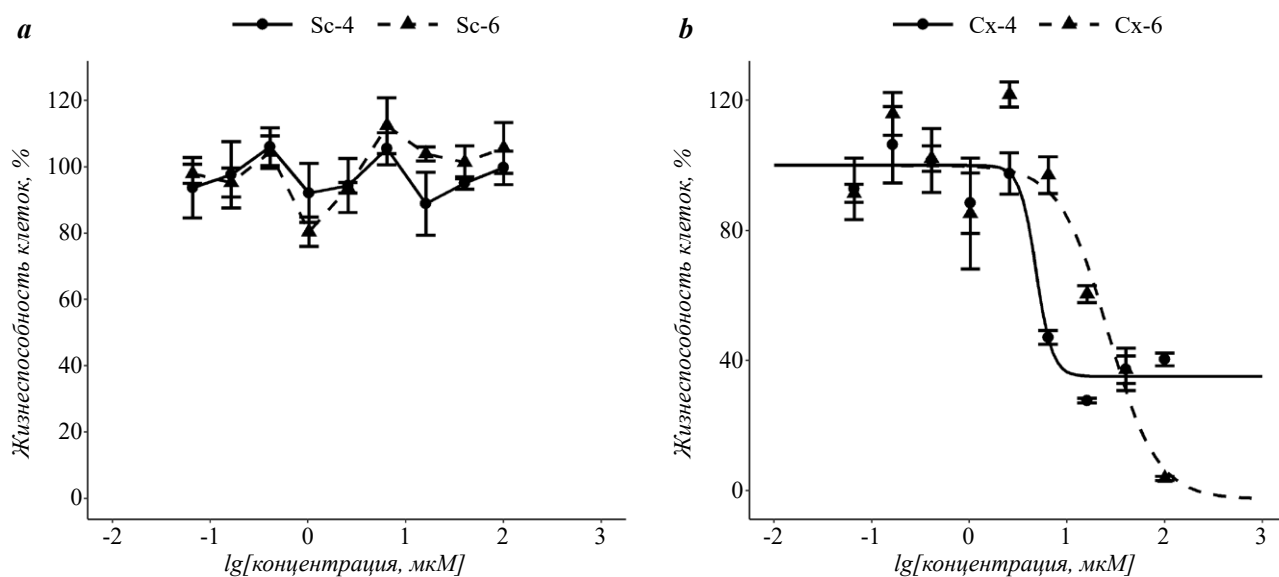


Рис. 3. Токсичность *p*-сульфокаликс[4 и 6]аренов (а) и каликс[4 и 6]аренов (b) в 2D-культуре клеток HT-29.

Fig. 3. Toxicity of *p*-sulfocalix[4 and 6]arenes (a) and calix[4 and 6]arenes (b) in 2D culture of HT-29 cells.

инокуляции в матрикель клетки HT-29 начинали формировать трехмерную структуру в форме сфероидов; через 96 ч к сформировавшимся сфероидам добавляли исследуемые препараты.

Ниже представлены результаты определения жизнеспособности 2D-культуры клеток HT-29 при действии на них полученных каликсаренов: Cx-4, Cx-6, Sc-4 и Sc-6 (рис. 3). Как видно из полученных данных, сульфопроизводные каликсаренов, Sc-4 и Sc-6, не оказывали заметного влияния на жизнеспособность опухолевых клеток (рис. 3a) — она практически не изменяется при всех исследованных концентрациях этих гидрофильных агентов. Однако незамещенные каликсарены, Cx-4 и Cx-6, оказались токсичными для клеток аденокарциномы толстого кишечника, при этом влияние Cx-4 и Cx-6 на клетки было принципиально различным (рис. 3b).

Обнаружено, что немодифицированный каликсарен Cx-6 снижал жизнеспособность клеток практически до 0 при увеличении концентрации до 100 мкМ. При аппроксимации полученных данных четырехпараметрической моделью [33] нижний предел жизнеспособности статистически значимо не отличался от нуля ($p = 0,92$) что позволяет сделать предположение об оказываемом им цитотоксическом действии. С другой стороны, Cx-4 в узком диапазоне концентраций: от 5 до 10 мкМ — резко снижал жизнеспособность клеток со 100 до 35% ($p < 0,001$), а при дальнейшем увеличении концентрации его токсичность не изменялась. Таким образом, полученные с использованием двумерной модели данные свидетельствуют о том, что Cx-4 оказывает

скорее цитостатический, а не цитотоксический эффект на клетки рака толстой кишки.

Аналогичные результаты получены и на трехмерной клеточной модели (рис. 4). Гидрофильные производные каликсаренов: Sc-4 и Sc-6, — содержащие сульфогруппы на верхнем ободе, не снижали жизнеспособность клеточных сфероидов HT-29 (рис. 4a). Незамещенный каликсарен Cx-4, как и в случае 2D-культуры, оказывал цитостатическое воздействие, снижая жизнеспособность клеток до уровня около 43%; в то время как гексамер Cx-6 проявлял цитотоксическую активность, понижая жизнеспособность 3D-культуры до 0 в концентрации около 10 мкМ и выше ($p = 0,86$).

Для всех исследованных соединений концентрации полумаксимального ингибирования (IC_{50}) жизнеспособности клеток статистически значимо не отличались на 2D- и 3D-моделях (табл. 1).

Таблица 1

Концентрации полумаксимального ингибирования каликсаренов для клеток HT-29

Half-maximal inhibitory concentrations of calixarenes for HT-29 cells

Культура	Соединение	IC_{50} , мкМ	95% CI*
2D	Cx-4	4,8	2,0–7,6
	Cx-6	26,3	0,0–65,1
3D	Cx-4	2,5	2,0–3,0
	Cx-6	4,0	3,4–4,5

*Примечание: CI – доверительный интервал.

*Note: CI — confidence interval.

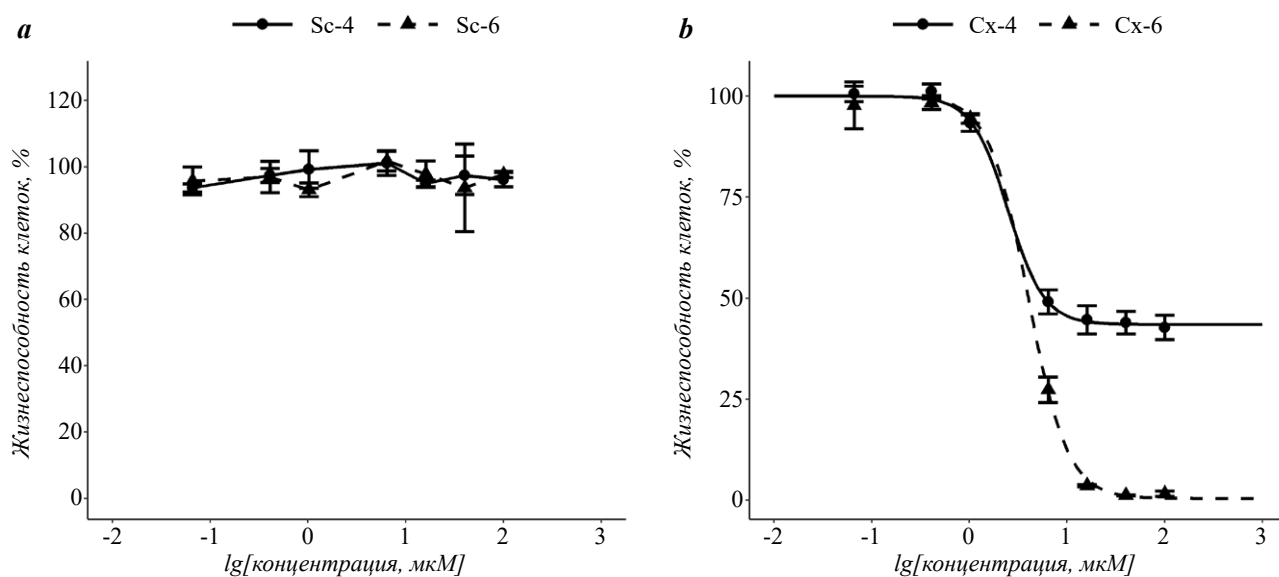


Рис. 4. Токсичность *p*-сульфокаликс[4 и 6]аренов (а) и каликс[4 и 6]аренов (b) на 3D-культуре клеток HT-29.

Fig. 4. Toxicity of *p*-sulfocalix[4 and 6]arenes (a) and calix[4 and 6]arenes (b) in 3D culture of HT-29 cells.

Ранее уже исследовали токсическое действие некоторых каликсаренов. Так, изучено влияние на различные опухолевые клетки производных дигидрофосфоновых кислот *n*-H-каликс[4]-, *трет*-бутилкаликс[4]- и *n*-октаноилкаликс[4]аренов, а также оценена их активность в сравнении со стандартными противоопухолевыми препаратами [34]. Синтезированные функционализированные производные Сх-4 оказались токсичными, особенно по отношению к клеточным линиям лимфобластного лейкоза и меланомы. Однако, несмотря на активное развитие этого медицинского направления в химии каликс[*n*]аренов, до сих пор ни одно из соединений этой группы не дошло до доклинических и клинических испытаний. И причина тому — недостаточное понимание молекулярных механизмов противораковой активности каликсаренов.

На сегодняшний день предложено несколько возможных механизмов влияния каликсаренов на опухолевые клетки, среди которых отметим следующие: 1) ингибирование опухольспецифичных ферментов [35], 2) ингибирование ангиогенеза [36], 3) модуляция врожденного иммунитета [37, 38], 4) подавление онкогенов и активация генов-супрессоров опухолей [39].

Эффект и механизм действия каликсаренов также подробно изучен в отношении клеточной линии карциномы поджелудочной железы, сверхэкспрессирующей рецепторы тирозинкиназы AXL и Mer [40]. Pelizzaro-Rocha и соавт. исследовали противоопухолевую активность шести различных каликсаренов: Сх-4, Сх-6, Сх-8 — и их производных, содержащих *трет*-бутильные

группы на верхнем ободе. Жизнеспособность клеток оценивали через 24 ч после обработки в МТТ-тесте. Показано, что незамещенный каликсарен Сх-6 снижал жизнеспособность клеток в зависимости от дозы и был более эффективным, чем широкоприменяемый противораковый препарат 5-фторурацил. Соединение эффективно устраняло сигнальную трансдукцию рецепторов AXL и Mer, снижало их уровни, стимулируя процесс деградации. Что касается соединения Сх-4, в состав которого входит четыре фенольных кольца, для него была выявлена слабая цитотоксическая активность, в то время как для каликс[8]арена, с восемью фенольными звеньями, не обнаружена вообще. Стоит отметить, что введение гидрофобного ядра (например, *трет*-бутильных групп) на верхний обод каликсаренов снижало активность этих соединений независимо от размера их полости.

Таким образом, нами показано, что *p*-сульфопроизводные каликсаренов не обладают токсичностью по отношению к клеткам рака толстой кишки. Однако эти соединения могут быть использованы для создания тераностических и/или солубилизирующих агентов для таргетной доставки лекарственных препаратов к опухолевым клеткам.

С помощью МТС-теста изучена токсичность каликс[4]- и каликс[6]аренов и их сульфопроизводных на клеточной линии колоректальной аденокарциномы HT-29, культивируемой в 2D- и 3D-форматах. Установлено, что несulfатированные каликсарены снижают жизнеспособность раковых клеток, причем каликс[6]арен оказывал цитотоксическое действие, а каликс[4]арен — цитостатическое. Введение сульфогрупп на верхний

обод каликсаренов приводит к образованию макроциклов, содержащих гидрофобную ароматическую полость, — сульфокаликсаренов, которые, независимо от размеров полости, не влияли на жизнеспособность клеточной линии HT-29.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (проект № 19-15-00397).

ЛИТЕРАТУРА

1. Elflein J. Diseases — Statistics and Facts. *Health, Pharma & Medtech*, 2020. <https://www.statista.com/topics/2070/diseases/>
2. Tauran Y., Coleman A., Perre F., Kim B. Cellular and *in vivo* biological activities of the calix[n]arenes. *Curr. Org. Chem.*, 2015, 19, 2250–2270. doi: 10.2174/1385272819666150608222114
3. Dhawan B., Chen S.-I., Gutsche C.D. Calixarenes, 19. Studies of the formation of calixarenes via condensation of *p*-alkylphenols and formaldehyde. *Macromol. Chem. Phys.*, 1987, 188, 921–950. <https://doi.org/10.1002/macp.1987.021880501>
4. Neagu M., Ion R.M., Manda G., et al. Antitumoral effect of calixarenes in experimental photodynamic therapy with K562 tumor cell line. *Rom. J. Biochem.*, 2010, 47, 17–35. http://journal.biochim.ro/archive/n47-1/pdfs_47-1/rjb47-1_02.pdf
5. Dings R.P.M., Miller M.C., Nesmelova I., et al. Antitumor agent calixarene 0118 targets human galectin-1 as an allosteric inhibitor of carbohydrate binding. *J. Med. Chem.*, 2012, 55, 5121–5129. doi: 10.1021/jm300014q
6. Oguz M., Gul A., Karakurt S., Yilmaz M. Synthesis and evaluation of the antitumor activity of calix[4]arene l-proline derivatives. *Bioorg. Chem.*, 2020, 94, 103207. doi: 10.1016/j.bioorg.2019.103207
7. Mokhtari B., Pourabdollah K. Applications of calixarene nano-baskets in pharmacology. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, 2012, 73, 1–15. <https://doi.org/10.1007/s10847-011-0062-z>
8. Zhou Y., Li H., Yang Y.-W. Controlled drug delivery systems based on calixarenes. *Chin. Chem. Lett.*, 2015, 26, 825–828. doi: 10.1016/j.ccllet.2015.01.038
9. An L., Wang J., Liu J., et al. Design, preparation, and characterization of novel calix[4]arene bioactive carrier for antitumor drug delivery. *Front. Chem.*, 2019, 7, 732. doi: 10.3389/fchem.2019.00732
10. Shinkai S., Araki K., Matsuda T., et al. NMR and crystallographic studies of a *p*-sulfonatocalix[4]arene-guest complex. *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, 112, 9053–9058. <https://doi.org/10.1021/ja00181a004>
11. Nimse S.B., Kim T. Biological applications of functionalized calixarenes. *Chem. Soc. Rev.*, 2013, 42, 366–386. doi: 10.1039/C2CS35233H
12. Giuliani M., Morbioli I., Sansone F., Casnati A. Moulding calixarenes for biomacromolecule targeting. *Chem. Commun.*, 2015, 51, 14140–14159. doi: 10.1039/C5CC05204A
13. Gutsche C.D., Pagoria P.F. Calixarenes. 16. Functionalized calixarenes: the direct substitution route. *J. Org. Chem.*, 1985, 50, 5795–5802. <https://doi.org/10.1021/jo00350a071>
14. Shinkai S., Mori S., Tsubaki T., et al. New water-soluble host molecules derived from calix[6]arene. *Tetrahedron Lett.*, 1984, 25, 5315–5318. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)81592-6](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)81592-6)
15. Orr G.W., Barbour L.J., Atwood J.L. Controlling molecular self-organization: formation of nanometer-scale spheres and tubules. *Science*, 1999, 285, 1049–1052. doi: 10.1126/science.285.5430.1049
16. Gorbunov A., Iskandarova A., Puchnin K., et al. A route to virtually unlimited functionalization of water-soluble *p*-sulfonatocalix[4]arenes. *Chem. Commun.*, 2020, 56, 4122–4125. doi: 10.1039/D0CC01196G
17. Chen M.-X., Li T., Peng S., Tao D. Supramolecular nanocapsules from the self-assembly of amphiphilic calixarene as a carrier for paclitaxel. *New J. Chem.*, 2016, 40, 9923–9929. doi: 10.1039/C6NJ01986B
18. Wang Y.-X., Guo D.-S., Duan Y.-C., et al. Amphiphilic *p*-sulfonatocalix[4]arene as “drug chaperone” for escorting anticancer drugs. *Sci. Rep.*, 2015, 5, 9019. <https://doi.org/10.1038/srep09019>
19. Perret F., Coleman A.W. Biochemistry of anionic calix[n]arenes. *Chem. Commun.*, 2011, 47, 7303. doi: 10.1039/C1CC11541C
20. Español E., Villamil M. Calixarenes: generalities and their role in improving the solubility, biocompatibility, stability, bioavailability, detection, and transport of biomolecules. *Biomolecules*, 2019, 9, 90. doi: 10.3390/biom9030090
21. Liu Y., Li C.-J., Guo D.-S., et al. A comparative study of complexation of β -cyclodextrin, calix[4]arenesulfonate and cucurbit[7]uril with eye guests: fluorescence behavior and binding ability. *Supramol. Chem.*, 2007, 19, 517–523. doi: 10.1080/10610270601145444
22. Guo D.-S., Liu Y. Supramolecular chemistry of *p*-sulfonatocalix[n]arenes and its biological applications. *Acc. Chem. Res.*, 2014, 47, 1925–1934. doi: 10.1021/ar500009g
23. Brown S.D., Plumb J.A., Johnston B.F., Wheate N.J. Folding of dinuclear platinum anticancer complexes within the cavity of *para*-sulfonatocalix[4]arene. *Inorg. Chim. Acta*, 2012, 393, 182–186. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2012.04.033>
24. Galindo-Murillo R., Olmedo-Romero A., Cruz-Flores E., et al. Calix[n]arene-based drug carriers: a DFT study

- of their electronic interactions with a chemotherapeutic agent used against leukemia. *Comput. Theor. Chem.*, 2014, 1035, 84–91. doi: 10.1016/j.comptc.2014.03.001
25. Galindo-Murillo R., Sandoval-Salinas M.E., Barroso-Flores J. *In silico* design of monomolecular drug carriers for the tyrosine kinase inhibitor drug imatinib based on calix- and thiacalix[n]arene host molecules: a DFT and molecular dynamics study. *J. Chem. Theory Comput.*, 2014, 10, 825–834. doi: 10.1021/ct4004178
 26. Wang K., Guo D.-S., Wang X., Liu Y. Multistimuli responsive supramolecular vesicles based on the recognition of *p*-sulfonatocalixarene and its controllable release of doxorubicin. *ACS Nano*, 2011, 5, 2880–2894. doi: 10.1021/nn1034873
 27. Coleman A.W., Jebors S., Cecillon S., et al. Toxicity and biodistribution of *para*-sulfonato-calix[4]arene in mice. *New J. Chem.*, 2008, 32, 780–782. doi: 10.1039/B718962A
 28. Gutsche C.D., Lin L.-G. Calixarenes 12: the synthesis of functionalized calixarenes. *Tetrahedron*, 1986, 42, 1633–1640. doi: 10.1016/S0040-4020(01)87580-3
 29. Tauran Y., Brioude A., Shahgaldian P., et al. Calix-arene silver nanoparticles interactions with surfactants are charge, size and critical micellar concentration dependent. *Chem. Commun.*, 2012, 48, 9483. doi: 10.1039/C2CC34670B
 30. Romero-Calvo I., Weber C.R., Ray M., et al. Human organoids share structural and genetic features with primary pancreatic adenocarcinoma tumors. *Mol. Cancer Res.*, 2019, 17, 70–83. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-18-0531
 31. Sachs N., de Ligt J., Kopper O., et al. A living biobank of breast cancer organoids captures disease heterogeneity. *Cell*, 2018, 172, 373–386. doi: 10.1016/j.cell.2017.11.010
 32. Poloznikov A.A., Nikulin S.V., Bolotina L.V., et al. Comparison of 2D and 3D cell cultures of colorectal adenocarcinoma as models for drug screening. *Russ. Chem. Bull.*, 2019, 68, 2377–2380. doi: 10.1007/s11172-019-2716-8
 33. Ritz C., Baty F., Streibig J.C., Gerhard D. Dose-response analysis using R. *PLoS One*, 2015, 10, e0146021. doi: 10.1371/journal.pone.0146021
 34. Coleman W.A., Baggetto L.G., Lazar A.N., et al. Calixarene derivatives as anticancer agent. US Patent No 20100056482A1, 2010.
 35. Cherenok S.O., Yushchenko O.A., Tanchuk V.Y., et al. Calix[4]arene- α -hydroxyphosphonic acids. Synthesis, stereochemistry, and inhibition of glutathione S-transferase. *ARKIVOC*, 2012, 4, 278–298. <https://doi.org/10.3998/ark.5550190.0013.421>
 36. Zhou H., Wang D., Baldini L., et al. Structure–activity studies on a library of potent calix[4]arene-based PDGF antagonists that inhibit PDGF-stimulated PDGFR tyrosine phosphorylation. *Org. Biomol. Chem.*, 2006, 4, 2376–2386. doi: 10.1039/b515483a
 37. Viola S., Merlo S., Consoli G.M.L., et al. Modulation of C6 glioma cell proliferation by ureido-calix[8]arenes. *Pharmacology*, 2010, 86, 182–188. doi: 10.1159/000317518
 38. Geraci C., Consoli G.M.L., Granata G., et al. First self-adjuvant multicomponent potential vaccine candidates by tethering of four or eight MUC1 antigenic immunodominant PDTRP units on a calixarene platform: synthesis and biological evaluation. *Bioconjug. Chem.*, 2013, 24, 1710–1720. doi: 10.1021/bc400242y
 39. Kamada R., Yoshino W., Nomura T., et al. Enhancement of transcriptional activity of mutant p53 tumor suppressor protein through stabilization of tetramer formation by calix[6]arene derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2010, 20, 4412–4415. doi: 10.1016/j.bmcl.2010.06.053
 40. Pelizzaro-Rocha K.J., de Jesus M.B., Ruela-de-Sousa R.R., et al. Calix[6]arene bypasses human pancreatic cancer aggressiveness: downregulation of receptor tyrosine kinases and induction of cell death by reticulum stress and autophagy. *Biochim. Biophys. Acta*, 2013, 1833(12), 2856–2865. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.07.010

Study on the Toxicity of Calix[4]- and [6]-Arenes and their Sulfated Derivatives in Two- and Three-Dimensional Cell Cultures of Colorectal Adenocarcinoma

A.V. RAZUMOVSKAYA^{1,2}, S.V. NIKULIN^{1,3*}, B.Ya. ALEKSEEV³, A.N. GORBUNOV², I.M. VATSURO², V.V. KOVALEV², and A.A. POLOZNIKOV^{1,3}

¹ Faculty of Biology and Biotechnology, Higher School of Economics National Research University, Moscow, 101000, Russia

² Faculty of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991, Russia

³ National Medical Research Radiological Center, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 125284, Russia

*e-mail: snikulin@hse.ru

Received November 6, 2020

Accepted February 16, 2021

Abstract—A comparative study of the toxicity of two unsubstituted calixarenes consisting of 4 and 6 phenolic fragments, as well as their *p*-sulfated derivatives, was carried out on the HT-29 colorectal adenocarcinoma cells cultured in two-dimensional (2D) and three-dimensional (3D) formats. It was shown that both unsubstituted calixarenes decrease the viability of tumor cells; calix[4]arene and calix[6]arene exhibited a cytostatic and a cytotoxic effect, respectively. Sulfated derivatives of calixarenes did not have a pronounced toxic effect on HT-29 cells. However, due to their high hydrophilicity and the ability to form adducts with various therapeutic molecules, they can be used for delivery of anticancer drugs.

Key words: calixarenes, cytotoxicity, HT-29 cells, 2D cell culture, 3D cell culture

Funding—The work was financially supported by the Russian Science Foundation (project no. 19-15-00397).

doi: 10.21519/0234-2758-2021-37-1-87-94