УДК 615.012.1

ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ НОВЫХ 1,2,4-ТРИАЗИНОВ В ОТНОШЕНИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННО ПЕРЕРОЖДЕННЫХ КЛЕТОК

Андрей Алексеевич Зонов[1], Всеволод Викторович Мелехин[1,2], Мария Дмитриевна Тохтуева[1], Рамиль Фаатович Фатыхов[1], Айнур Диньмухаметович Шарапов[1], Анастасия Павловна Потапова[1]

[1]НОиИЦ ХФТ ХТИ, ФГАОУ ВО «Уральский Федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»

[2]ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ

Екатеринбург, Россия

Аннотация

Введение. Непрекращающееся увеличение случаев заболевания во всем мире делают онкологические заболевания одной из самых серьезных проблем здравоохранения. А поскольку ксантон и акридон и являются перспективными моделями для разработки соединений с противоопухолевой активностью, синтез их модифицированных аналогов представляет собой перспективное направление исследований. **Цель исследования –** определение эффективности противоопухолевого действия исследуемых аналогов акридонов и ксантонов на опухолевые клеточные линии. **Материал и методы.** Эксперименты проводились на культивируемых клетках глиобластомы человека (A-172), рака молочной железы (HS578T), и почки эмбриона человека (HEK-293). Цитотоксическая активность соединений определялась с помощью МТТ-теста. Помимо этого, высокоспецифичной детекцией апоптоза является флюоресцентное окрашивание клеток белком Annexin V, меченным флуоресцентной меткой (FITC). Другим анализом действия исследуемых соединений является окрашивание с целью определения способности клеток к синтезу ДНК. **Результаты.** В статье приведены результаты определения цитотоксического эффекта, рассчитаны значения концентрации полуингибирования (IC_{50}), оценено количество клеток в состоянии раннего апоптоза, поздноапоптическом и некротическом состоянии, а также фотографии, демонстрирующие способность клеток к синтезу ДНК. **Выводы.** Определена высокая эффективность некоторых из исследуемых препаратов, свидетельствующая о высоком потенциале их дальнейшего исследования.

Ключевые слова: триазины, МТТ-тест, аннексин, цитотоксическая активность, глиобластома

INVESTIGATION OF CYTOTOXIC EFFECT OF NEW MONO- AND AS-TRIAZINES ON MALIGNANTLY DEGENERATED CELLS

Andrey A. Zonov[1], Vsevolod V. Melekhin[1,2], Maria D. Tokhtueva[1], Ramil F. Fatykhov[1], Ainur D. Sharapov[1], Anastasia P. Potapova[1]

[1]Scientific, Educational and Innovation Center of the Chemical and Pharmaceutical Technologies, Institute of Chemical Technology, Ural Federal University named after the First President of Russia B.N. Yeltsin

[2]Ural state medical university
Yekaterinburg, Russia
Abstract

Introduction. The ongoing increase in cases worldwide is linked to cancer as one of the most serious health problems. Since xanthone and acridone are promising samples for the development of compounds with antitumor activity, their synthesis of modified derivatives is a promising line of research. **The purpose of the study** is to determinate the effectiveness of the antitumor effect of new acridone and xanthone derivatives on tumor cell lines. **Material and methods.** The experiment was carried out on human glioblastoma (A-172), breast cancer (HS578T), and human embryonic kidney (HEK-293) cells. Cytotoxic attachment activity was observed using the MTT assay. In addition, a highly specific detection of apoptosis is fluorescent staining of protein cells with fluorescently labeled annexin V (FITC). Another analysis of the impact on the body of infection is staining to determine the ability of cells to synthesize DNA. **Results.** The article presents the results of determining the cytotoxic effect, the expected value of half-inhibition (IC50), the increase in the number of cells in the state of early apoptosis, late apoptosis and necrotic state, as well as photographs, the developing ability of cells to synthesize DNA. **Conclusions.** A certain high efficacy of some of the selected drugs, indicating a high potential for their research.
Keywords: triazines, MTT test, annexin, cytotoxic activity, glioblastoma

ВВЕДЕНИЕ

Онкологические заболевания – собирательный термин, охватывающий широкую группу заболеваний, которые могут поражать любые органы и системы организма человека. Непрекращающееся увеличение случаев заболевания во всем мире делают онкологические заболевания одной из самых серьезных проблем здравоохранения [1]. Поэтому поиск новых соединений является важным направлением медицинской химии.

Ксантон и акридон и являются перспективными моделями для разработки соединений с противоопухолевой активностью, и при этом они могут быть обнаружены как в природных, так и в неприродных противоопухолевых соединениях [2,3]. Таким образом синтез модифицированных аналогов природных акридонов и ксантонов является перспективным направлением для исследований.

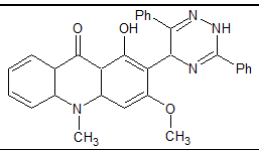
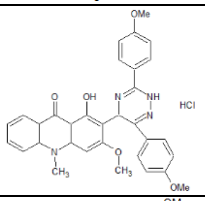
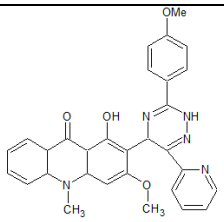
Цель исследования - определить эффективность противоопухолевого действия исследуемых аналогов акридонов и ксантонов на опухолевые клеточные линии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Таблица 2

Характеристика соединений

Соединение	Молекулярная масса	Растворимость	Формула	Значения IC50 ± SE		
				A172	HEK-293	HS578T

7a	524,16	ДМСО, ДМФА, этанол		6.9 ± 2.3	115.2 ± 15.6	7.1 ± 2.8
7e	584,18	ДМСО, ДМФА, этанол		3.6 ± 0.4	47.4 ± 4.0	1.7 ± 0.1
10a	555,17	ДМСО, ДМФА, этанол		>128	>128	>128

Исследования проведены на культивируемых клетках глиобластомы человека (A-172, ATCC CRL 1620) [4], рака молочной железы (HS578T, HTB-126) [5], и почки эмбриона человека (HEK-293, ATCC CRL 1573) [6], полученных из ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных» Института цитологии РАН (Россия, г. Санкт-Петербург). Клетки культивировали с использованием среды DMEM/F-12 (Thermo Fisher, США) с содержанием 10% фетальной бычьей сыворотки (Thermo Fisher, США) при 37 °C, 5% CO_2 и 98% влажности.

Клетки рассеивали в лунки 96-луночного планшета в посевной концентрации 4×10^3 клеток на лунку за день до внесения исследуемых веществ, в которых ряд 1 – контроль без клеток, ряд 2 и 3 – контроль с интактными клетками. Через 24 часа в лунки планшета вносили исследуемые соединения в заданном диапазоне концентраций. Затем клетки инкубировали в течение 24 часов, после чего в культуры вносили раствор MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) по 20 µL (5 mg/mL) на лунку. Через 2 часа из лунок удаляли среду и добавляли по 200 µL смеси ДМСО и изопропанола, 1:1. Оптическую плотность измеряли на планшетном спектрофотометре при длине волны 570 нм.

Высокоспецифичным и чувствительным методом детекции апоптоза является метод, основанный на обработке клеток белком Annexin V, меченным флуоресцентной меткой (FITC). Дополнительно использовался краситель Propidium Iodide (PI) для выявления клеток в позднем апоптозе или некрозе.

Измерение способности клетки к синтезу ДНК является одним из важнейших методом оценки пролиферативной активности клеток, определения токсичности и оценки противоопухолевых препаратов. Анализ EdU (5-этинил-2′-дезоксиуридин) представляет собой нуклеозидный аналог тимидина и встраивается в ДНК во время активного синтеза ДНК.

Статистическая обработка данных проведена в программе RStudio (Version 2022.07.1 © 2009-2022 RStudio, PBC) с использованием пакета R (version 4.2.1). Индекс цитотоксичности (IC_{50}) рассчитан с построением кривых доза-эффект с помощью пакета «drc» [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ

По результатам МТТ-теста были рассчитаны значения концентрации полуингибирования (IC_{50}± SE) на культурах клеток глиобластомы (A-172), почки эмбриона (Hek-293) и рака молочной железы человека (Hs-578T) представленные в таблице 1.

По результатам окрашивания клеток смесью Annexin V-FITC и PI было рассчитано количество живых, апоптических и мертвых клеток A172 и HEK-293 в результате действия соединений, показавших наибольшую эффективность в отношении подавления жизнеспособности клеток злокачественных новообразований – 7a и 7e (Рис. 1).

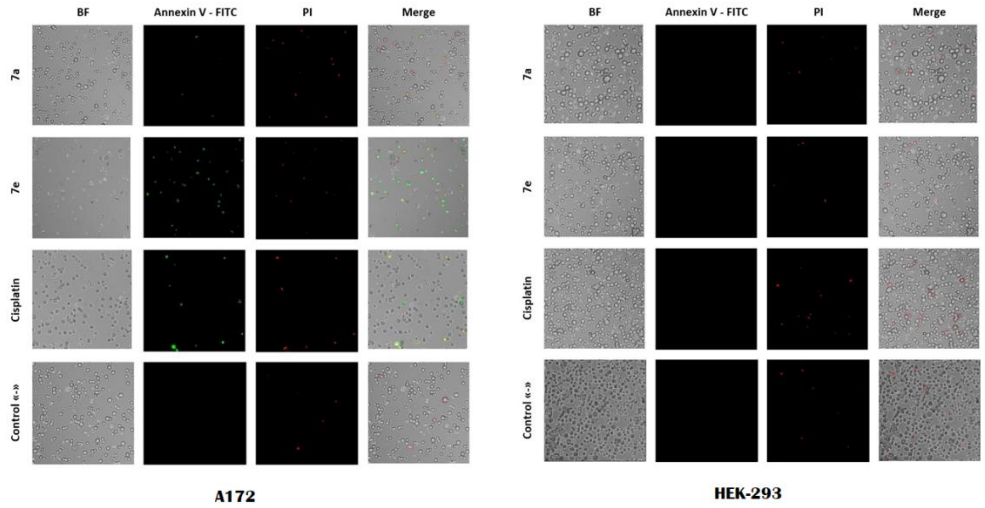


Рис. 1 Флюоресцентное окрашивание клеток красителями Annexin V-FITC и PI под действием исследуемых веществ 7a и 7e в сравнении с цисплатином (концентрация 6 μM) и интактными клетками. Увеличение 100x

По результатам окрашивания для оценки способности клеток к синтезу ДНК после действия двух соединений были получены данные представленные на Рис. 3.

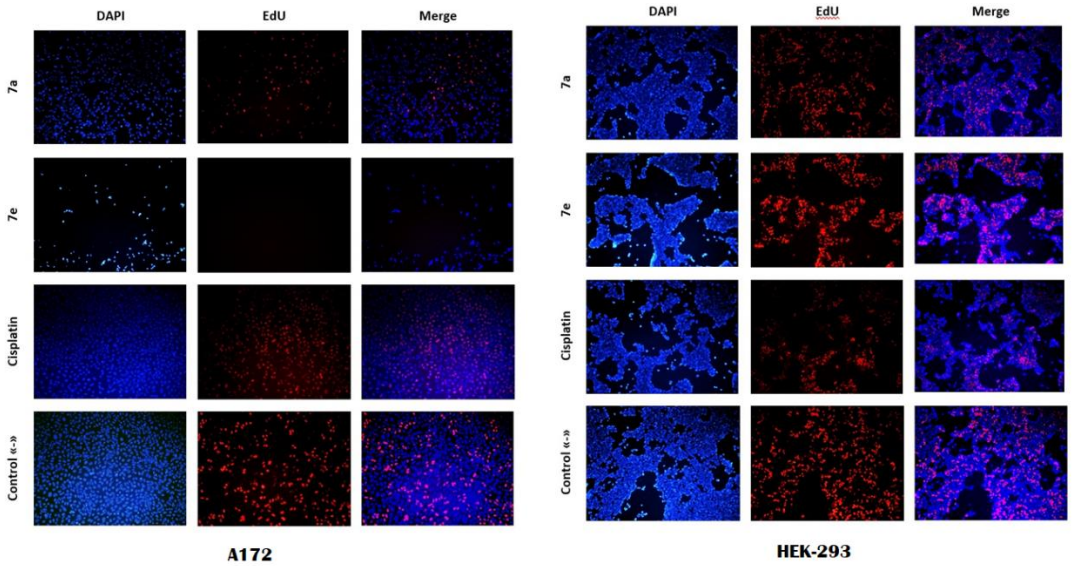


Рис. 2 Оценка интенсивности синтеза ДНК в культурах клеток под влиянием соединений 7a и 7e. Синим цветом окрашены ядра всех клеток с помощью красителя DAPI, красным – ядра клеток с активным синтезом ДНК (EdU). Увеличение 100x

ОБСУЖДЕНИЕ

Как следует из таблицы 1, наибольшее снижение жизнеспособности клеток злокачественных новообразований наблюдалось при добавлении соединений 7e и 7a, для которых также можно отметить выраженную избирательность в отношении опухолевых клеток, т.к. значения IC_{50} на линиях Hs-578T и A-172 для этих препаратов значительно ниже, чем IC_{50}, полученное на нормальных клетках линии Hek-293. По результатам флюоресцентного окрашивания мы можем подтвердить гипотезу о выраженном действии препарата 7e в отношении клеток злокачественных новообразований (Рис. 2), на примере линии A172. И одновременно с этим, существенного повышения количества погибших клеток на линии Hek-293 не отмечалось (Рис. 2). Оценивая влияние исследуемых соединений 7a и 7e на способность клеток к синтезу ДНК на линии HEK-293 (Рис. 2) можно отметить минимальный эффект, сопоставимый с интактными клетками, служившими отрицательным контролем. При этом на линии A172 (Рис. 2) можно отметить более выраженное действие соединений 7a и 7e на синтез ДНК в клетках. Также следует отметить, что в опыте с препаратом 7e не было обнаружено признаков пролиферации клеток. Таким образом, полученные результаты указывают на активацию апоптотических механизмов и ингибирование пролиферации в клетках глиобластомы под влиянием соединения 7e.

ВЫВОДЫ

1. Два из трех исследуемых соединений при первичном анализе с помощью МТТ-теста показали свою способность к ингибированию метаболической активности опухолевых клеток.

2. При дальнейшем исследовании соединений с помощью флюоресцентного окрашивания была отмечена избирательность действия на опухолевые клеточные линии по сравнению с нормальными клетками.

3. Так же одно из соединений продемонстрировало ингибирование пролиферации опухолевых клеток и практически полной отсутствие оной против нормальных клеток.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Chhikara, B. S. Global Cancer Statistics 2022: the trends projection analysis / B. S. Chhikara, K. Parang // Chemical Biology Letters. – 2023. – Vol. 10, № 1. – P. 451.
2. 2,2-Dimethyl-2*H*-pyran-derived alkaloids I. Practical synthesis of acronycine and benzo[*b*]acronycine and their biological properties / A. F. M. Motiur Rahman, J. L. Liang, S. H. Lee [et. al.]. // Archives of pharmacal research. – 2008. – Vol.31. – P. 1087–1093.
3. An Update on the anticancer activity of xanthone derivatives: A review / Y. S. Kurniawan, K. T. A. Priyangga, H. D. Pranowo [et al.] // Pharmaceuticals. – 2021. – Vol.14, № 11. – P. 1144.
4. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors / D. J. Giard, S. A. Aaronson, G. J. Todaro [et. al] // Journal of the National Cancer Institute. – 1973. – Vol. 51, №5. – P.1417-1423.
5. Two syngeneic cell lines from human breast tissue: the aneuploid mammary epithelial (Hs578T) and the diploid myoepithelial (Hs578Bst) cell lines. / A. J. Hackett, H. S. Smith, E.L. Springer [et. al.] // Journal of the National Cancer Institute. – 1977. – Vol.58, № 6. – P.1795-806.
6. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5 / F. L. Graham, J. Smiley, W. C. Russell [et al.] //Journal of general virology. – 1977. – Т. 36, № 1. – С. 59-72.
7. Dose-response analysis using R / C. Ritz, F. Baty, J. C. Streibig [et al.] // PloS one. – 2015. – Т. 10, № 12. – С. e0146021.

Сведения об авторах

А.А. Зонов* – аспирант
В.В. Мелехин – кандидат медицинских наук, доцент, заведующий лабораторией ПБКиГТ
М.Д. Тохтуева – аспирант, инженер-исследователь лаборатории ПБКиГТ НОиИЦ ХФТ ХТИ УрФУ
Р.Ф. Фатыхов – кандидат химических наук, младший научный сотрудник
А.Д. Шарапов – младший научный сотрудник
А.П. Потапова – студент магистратуры, инженер-исследователь лаборатории кафедры органической и биомолекулярной химии

Information about the authors

A. A. Zonov* - Postgraduate student
V.V. Melekhin – Candidate of Science (Medicine), Associate Professor, Head of the Laboratory of Primary Bioscreening, Cellular and Gene Technologies
M.D. Tokhtueva* – Research engineer of the Laboratory of Primary Bioscreening, Cellular and Gene Technologies
R.F. Fatyhov – Candidate of Sciences (Chemistry), Junior researcher

A.D. Sharapov – Junior researcher
A.P. Potapova – M.S. student, Research engineer of the Laboratory of the Department of Organic and Biomolecular Chemistry
***Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):**
zontikist@mail.ru

УДК 615.036.8

КОМПЛЕКСНАЯ МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ ГЕРОПРОФИЛАКТИКА У ПАЦИЕНТОВ СТАРШЕГО ПОКОЛЕНИЯ С ПОЛИМОРБИДНОСТЬЮ

Андрей Евгеньевич Кейних[1], Артемий Андреевич Вилков[1], Юлия Фанисовна Салимова[1], Екатерина Александровна Андреева[1], Илья Валерьевич Гаврилов[1,3], Наталья Матвеевна Черепанова[1,2,3], Надежда Станиславовна Манакова[3], Оксана Викторовна Лимановская[1,2,3], Виктор Николаевич Мещанинов[1,3]
[1]Кафедра биохимии
ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
[2]Геронтологическое отделение ЦГКБ № 3
[3]ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»
Екатеринбург, Россия

Аннотация

Введение. Поли- и коморбидность часто ассоциирована с пациентами старшего поколения. Для геропрофилактики при этом целесообразно использовать фармпрепараты-полипиллы, имеющие многоцелевое действие и усиливающие эффект лечения. Инозин + Никотинамид + Рибофлавин + Янтарная кислота (Код АТХ: N07XX) – полипилл метаболического действия, который включает в себя несколько активных веществ. **Цель исследования** – обнаружить геропрофилактическую активность и возможные ее механизмы в условиях применения Инозина + Никотинамида + Рибофлавина + Янтарной кислоты; (Код АТХ: N07XX) у пациентов старшего поколения с полиморбидностью. **Материал и методы.** Исследуемая группа состояла из 35 пациентов-добровольцев мужского и женского пола в возрасте старше 60 лет, имеющих полиморбидную патологию. Они проходили 2-х недельное стационарное лечение, включающее полипилл. **Результаты.** У пациентов после лечения было обнаружено снижение биологического возраста в среднем на 2 года за счет нормализации функциональных показателей организма: артериальное давление, статическая проба, когнитивный тест. **Выводы.** Применение Инозина + Никотинамида + Рибофлавина + Янтарной кислоты (Код АТХ: N07XX) в качестве комплексной метаболической геропрофилактики у пациентов старшего поколения с полиморбидностью благоприятно влияет жизненно-важные физиологические показатели и снижает биологический возраст.

Ключевые слова: старшее поколение, полиморбидность, полипилл, биологический возраст.