

3.Вернер, Н.А. Перименопауза и климактерический период как социальный и медицинский феномен: обзор литературы / Н.А. Вернер // Научный руководитель. - 2017. - № 4 (22). - С. 62-70

4.Суханова, А.А. Современные аспекты ведения женщин в климактерический период / А.А. Суханова, О.И. Гервазюк // Здоровье женщины. - 2016. - № 5 (111). - С. 130

5.Чучалина, Л.Ю. Особенности состояния здоровья женщин зрелого возраста / Л.Ю. Чучалина // Современные проблемы науки и образования. - 2017. - № 1. - С. 57

УДК 615.015.35

**Балданшириева А.Д., Губина О.Г., Мелехин В.В.,
Смышляева Л.А., Макеев О.Г.**

**ОБЩАЯ ТОКСИЧНОСТЬ ПЕРСПЕКТИВНЫХ МОЛЕКУЛ ДЛЯ
БОРНЕЙТРОНЗАХВАТНОЙ ТЕРАПИИ INVITRO**

Кафедра медицинской биологии и генетики

Уральский государственный медицинский университет

Отдел молекулярных и клеточных технологий и радиоизотопная лаборатория
ЦНИЛ

Уральский федеральный университет им. первого президента России Б.Н.
Ельцина

ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий
Екатеринбург, Российская Федерация

**Baldanshirieva A.D., Gubina O.G., Melekhin V.V.,
Smyshlyayeva L.A., Makeev O.G.**

**THE GENERAL TOXICITY OF PROMISING MOLECULES FOR BORON
NEUTRON CAPTURE THERAPY IN VITRO**

Department of Medical Biology and Genetics

Ural State Medical University

Department of Molecular and Cell Technologies and Radioisotope Laboratory
Ural Federal University

Institute of Medical Cell Technologies
Yekaterinburg, Russian Federation

E-mail: larim@mail.ru

Аннотация. В статье рассмотрено токсическое влияние четырех образцов потенциальных агентов для борнейтронзахватной терапии на культуру интактных клеток, определена концентрация полумаксимального ингибирования (IC50).

Annotation. The article deals the toxic effect of four preparation's samples for boron neutron capture therapy in the intact cell culture. Concentrations of semi-maximal inhibition were calculated (IC50).

Ключевые слова: борнейтронзахватная терапия онкологических заболеваний, клеточная линия легких эмбриона человека, цитотоксичность.

Key words: boron neutron capture therapy, human embryo lung cells, cytotoxicity.

Введение

Технологии борнейтронзахватной терапии онкологических заболеваний (далее – БНЗТ) в нашей стране только развиваются. Одним из аспектов, сдерживающих становление технологии, является отсутствие зарегистрированных отечественных препаратов для ее проведения. Химико-технологическим институтом Уральского Федерального Университета синтезирована серия молекул – потенциальных агентов для борнейтронзахватной терапии.

Данные вещества обладают рядом преимуществ по сравнению с применяемым за рубежом препаратом для БНЗТ борфенилаланином: более водорастворимы, характеризуются высоким содержанием бора в молекулах (в одной молекуле борфенилаланина содержится один атом бора, в исследуемых образцах – 9 атомов), – чем обусловлена перспектива их дальнейшего исследования.

Одним из требований к препаратам для борнейтронзахватной терапии онкологических заболеваний является их низкая токсичность в отношении интактных клеток.

Цель исследования – отобрать из четырех синтезированных веществ наиболее перспективные для дальнейшего исследования на основании данных об их цитотоксичности.

Материалы и методы исследования

Образцы борсодержащих препаратов были синтезированы на кафедре органической и биомолекулярной химии химико-технологического института УрФУ. Вещества № 1-4 являются низкомолекулярными соединениями класса карборанов, растворимы в воде, этилацетате, бензоле, ДМСО и ацетоне.

Объект исследования – клеточная линия легких эмбриона человека (ЛЭЧ-3-81). Культура клеток ЛЭЧ-3-81 была получена от ФБУН «Екатеринбургский НИИ вирусных инфекций» Роспотребнадзора (ЕНИИВИ).

Культивирование клеток проводили в условиях 37°C, концентрации CO₂ 5% и влажности 95% в среде DMEM/HamF-12 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки в инкубаторе (Sanyo, Япония). Ежедневно контролировали состояние культур клеток с использованием инвертированного микроскопа с системой фотовидеодокументирования Olympus СКХ 41. Смену культуральной среды осуществляли через каждые два дня на 50% [1,2].

Цитотоксичность веществ оценивали методом морфологического анализа (вещества 1,2), МТТ-теста (набор TOX1, Sigma Aldrich) (вещества 1-4).

Оценку морфологических параметров проводили на культуре клеток ЛЭЧ-3-81. На подготовительном этапе культивируемые клетки высаживали в чашки Петри с адгезивным покрытием (Sarstedt). Для получения достоверных данных в каждой группе использовали три повторности. Контрольная группа была представлена интактными клетками ЛЭЧ-3-81. В соответствии с рекомендациями Международного номенклатурного комитета по классификации клеточной смерти оценка цитотоксического эффекта проводилась с использованием морфологических критериев. Спустя 3, 24 и 48 часов культивируемые клетки окрашивали по методу Романовского.

Цитотоксическую активность определяли с использованием колориметрического теста посредством оценки метаболической активности клеток, выживаемость при этом определялась как сохранение метаболизма после прекращения действия исследуемых веществ. Данный метод основан на способности митохондриальных дегидрогеназ живых клеток восстанавливать 3-(4,5-лиметилтиазол-2-ил)-2,5-лифенил-2Н-тетразолиум (МТТ) бромид в формазан, который кристаллизуется внутри клеток. Кристаллы формазана переводили в раствор с помощью органических растворителей и затем измеряли оптическую плотность как экспериментальных, так и контрольной групп.

Для анализа цитотоксического эффекта культуру клеток высаживали на 96-луночные культуральные планшеты (Sarstedt). По достижении клетками конфлюентности 70% вносили исследуемые вещества в различных концентрациях на три часа. Через 3 часа среду с исследуемым агентом полностью удаляли. Дальнейший анализ образцов проводили в соответствии с рекомендациями производителя TOX1: в лунки вносили 200 мкл ростовой среды с 10% содержанием готового раствора для проведения МТТ-теста, культивирование проводили в тех же условиях в течение 4 часов. По истечении 4 часов удаляли внесенный раствор и экстрагировали образовавшийся формазан добавлением 100 мкл лизирующего раствора. Оптическую плотность регистрировали на вертикальном спектрофотометре (Multiskan GO Thermo Scientific, Япония) при длине волны 570 нм.

Статистическую обработку данных проводили в программе RStudio (Version 0.99.903 – © 2009-2016 RStudio Inc). Цитотоксическую активность потенциальных агентов – IC50 – определяли методом простой линейной регрессии. Данные принимали как достоверные при значении $p < 0,05$. Результаты представлены в мкг вещества на 1 мл смеси культуральной среды и фетальной бычьей сыворотки, а также в μM .

Результаты исследования и их обсуждение

При морфологической оценке в контрольной группе наблюдали клетки разной степени дифференцировки, преобладали клетки отростчатой формы с выраженными клеточными контактами и оформленным ядром.

При использовании вещества № 2 в концентрации до 190 μM включительно культура была представлена клетками разной степени дифференцировки, однако количество юных форм заметно снизилось по сравнению с контрольной группой. При внесении вещества № 1 в той же концентрации выраженных морфологических изменений обнаружено не было.

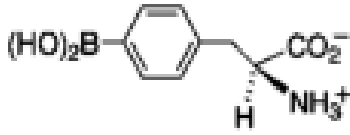



При повышении используемой концентрации вещества № 2 до 230 μM отмечали цитотоксический эффект, что выражалось в ухудшении адгезии клеток, вакуолизации цитоплазмы, нарушениях структуры клеточной мембраны, пикнозе ядра и преобладании зрелых форм. При внесении вещества № 1 в той же концентрации и экспозиции наблюдалось преобладание зрелых форм клеток.

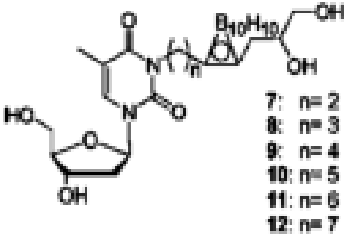
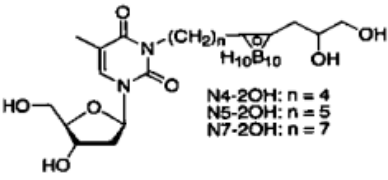
Дальнейшее увеличение концентрации веществ сопровождалось увеличением числа очаговых скоплений, в центре которых располагались клетки с выраженными признаками деструкции.

При проведении исследований на культуре клеток ЛЭЧ-3-81 было установлено, что наименьшей цитотоксичностью обладает вещество № 4, индекс цитотоксичности составил 953 μM . IC50 для вещества № 3 – 623 μM , вещества № 2 – 415,8 μM , вещества № 1 – 271,39 μM . При сравнении данных веществ с другими соединениями класса карборанов третьего поколения, синтезированных в клозо форме (табл. 1), было установлено, что исследуемые вещества обладают меньшей токсичностью. Так, среди представленных в литературе соединений наиболее токсичным явился образец 6 с IC50 = 20 μM . Наиболее близкие к IC50 исследуемых образцов значения концентрации полумаксимального ингибирования были представлены у веществ 2, 7, 8, 9 (>160 μM) [3,4].

Таблица 1

Сравнительная токсичность карборанов и ВРА в условиях invitro

Название препарата	Формула	IC50, мкмоль/л
Исследуемое вещество № 1	C10 H18 N1 O3 B9 Cs	271,39
Исследуемое вещество № 2	C10 H15 N2 B9 Cs	415,8
Исследуемое вещество № 3	C13 H21 N2 B9 Cs	623
Исследуемое вещество № 4	C16 H19 N4 B9 Cs	953
Борфенилаланин		>2403,85
1		142
2		>160
3		119

4	 <p>7: n = 2 8: n = 3 9: n = 4 10: n = 5 11: n = 6 12: n = 7</p>	56	
5		39	
6		20	
7		>160	
8		>160	
9		>160	
10		113	
11		67	
12		38	
13 (N5-2OH)		 <p>N4-2OH: n = 4 N5-2OH: n = 5 N7-2OH: n = 7</p>	43
14 (N7-2OH)			22
15 (N5)			24
16 (N7)	23		

Примечание: вещества № 1-4 в верхней части таблицы – исследуемые

Источником информации о токсичности веществ № 1-16 явилась литература.

Представленные в таблице молекулы, за исключением борфенилаланина, – вещества третьего поколения, класса карборанов, синтезированы в клозо форме, прошли тестирование на клеточной линии интактных клеток. Образцы 1 – 16 являются высокомолекулярными агентами, что может осложнить их возможное применение, так как молекулярная масса влияет на поглощение вещества клетками, прохождение гематоэнцефалического барьера при невозможности введения *in situ*. Исследуемые же вещества № 1-4 являются низкомолекулярными.

Выводы

Исследование токсичности образцов веществ для БНЗТ позволило выделить наиболее перспективные агенты для дальнейшего изучения – вещества № 3 и 4.

Выявлено, что все вещества (№ 1-4) имеют меньшую токсичность по сравнению с другими соединениями класса карборанов при исследовании на интактных клеточных культурах.

Содержание бора в одной молекуле исследуемых веществ в девять раз больше по сравнению с одной молекулой борфенилаланина, что позволяет предположить: накопление борфенилаланина в высоких концентрациях внутри клетки по эффективности в отношении противоопухолевого эффекта может соответствовать накоплению меньшего количества веществ класса карборанов,

что в определенной степени нивелирует несколько большую токсичность исследуемых веществ.

Список литературы:

1. Фрешни Р.Я. Культура животных клеток. Практическое руководство; пер. 5-го англ. изд. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. – 691 с.
2. Цыган В.Н., Камилова Т.А., Скальный А.В. и др. Патолофизиология клетки. – СПб.: ЭЛБИ-СПб, 2014 – 128 с.
3. Al-Madhoun A.S., Johnsamuel J., Barth R.F., Tjarks W., Eriksson S. Evaluation of human thymidine kinase 1 substrates as new candidates for boron neutron capture therapy // Cancer Res – 2004. - V.64. – P. 6280 – 6286
4. Barth R.F., Yang W., Al-Madhoun A., et al. Boron-containing nucleosides as potential delivery agents for neutron capture therapy of brain tumors // Cancer research. – 2004. - V.64. – P. 6287– 6295

УДК 616.079.3

Банина Д.Ю.

**АКТУАЛЬНОСТЬ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ДЛЯ
ДИАГНОСТИКИ СИНДРОМА ЖИЛЬБЕРА**

Департамент биологии и фундаментальной медицины
Уральский федеральный университет
Екатеринбург, Российская Федерация

Banina D.Y.

**RELEVANCE OF MOLECULAR GENETIC ANALYSIS FOR DIAGNOSIS
OF GILBERT'S SYNDROME**

Department of Biology and Fundamental Medicine
Ural Federal University
Yekaterinburg, Russian Federation

E-mail: baninadarya@gmail.com

Аннотация. В статье рассмотрена изменчивость ТА-повторов промоторной области гена UGT1A1, приводящая к изменению активности УДФ-глюкуронилтрансферазы. Пониженная активность этого фермента является одной из причин синдрома Жильбера (СЖ). Цель работы - установить актуальность молекулярно-генетического анализа для диагностики СЖ. Была исследована изменчивость ТА-повторов у 168 жителей Екатеринбурга с использованием методов ПЦР, электрофореза, секвенирования. В обследуемой группе были выявлены три из четырех известных аллелей гена UGT1A1 ((ТА)₅, (ТА)₆ и (ТА)₇). Частоты генотипов распределились следующим образом: генотип (ТА)₆/(ТА)₆ – 42,8%, (ТА)₆/(ТА)₇ – 41,7 %, (ТА)₇/(ТА)₇ – 14,9%, редкий