

УДК: 57.044

ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ СИНТЕЗИРОВАННЫХ ВЕЩЕСТВ - КАНДИДАТОВ, ОБЛАДАЮЩИХ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТЬЮ В ОТНОШЕНИИ SARS-CoV-2, НА МОДЕЛЬНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ

Елизавета Анатольевна Яковлева¹, Олег Германович Макеев²

^{1,2}ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Екатеринбург, Россия

¹kepler2202@yandex.ru

Аннотация

Введение. В мире зафиксировано более 504 млн случаев заболевания Новой Коронавирусной Инфекцией (COVID-19), возбудителем которой является вирус SARS-CoV-2. Отсутствие адекватной этиотропной противовирусной терапии представляется значительной проблемой, над которой трудятся исследовательские коллективы различных лабораторий, синтезируя перспективные в данном плане соединения. Синтезируемые вещества нуждаются в комплексной оценке, так как могут обладать значимыми побочными эффектами, опосредованными токсичностью в отношении различных тканей, систем органов человека. основополагающим параметром, нуждающимся в оценке на этапе разработки, синтеза и отбора, является цитотоксичность перспективных веществ-кандидатов *in vitro*. Оптимальным методом является оценка клеточной цитотоксичности на модели культур клеток человека. **Цель исследования** - определение клеточной токсичности предоставленных заказчиком реплик триазавирина под кодовым наименованием T01, T02, и T03 на модели культур клеток человека. **Материалы и методы.** В качестве модельных культур клеток использованы клеточные линии B2. Sp (селезеночная ткань), ЛЭЧ 3/81 (ткани эмбриона человека), MDCK II (почечная ткань), H5 (гепатоцитарная ткань). Оценка цитотоксического эффекта основывалась на витальных тестах. Индекс цитотоксичности (IC50) определяли с использованием колориметрического теста посредством оценки метаболической активности клеток. Статистическую обработку данных проводили в программном пакете Statistica 6.0. **Результаты.** В отношении клеток линии ЛЭЧ 3/81 (легкие эмбриона человека) наибольшей цитотоксичностью обладают соединения T01 (IC50-0.015491 мкг/мл) и T03 (IC50-0.133139 мкг/мл), а наименьшей - T02 (IC50 - 3.588634 мкг/мл). результаты исследования линий клеток B2. Sp и MDCK II характеризуются сходной направленностью: индекс цитотоксичности соединений T01 и T03 по IC50 остается относительно высоким и находится в пределах от 0.017189858 до 0.025085 мкг/мл для B2. Sp и IC50 0.018456 и 0.192311 мкг/мл для MDCK II соответственно. В то же время соответствующее значение токсичности препарата T02 вновь значимо ниже этих значений (IC50-3.451552 мкг/мл и IC50 4,343635 мкг/мл для B2. Sp и MDCK II соответственно). Для H5 - IC50 для T03

составляет 0.190575 мкг/мл и 0,190575 - для T01с одной стороны, а у соединения T02 - 0.753665 мкг/мл. **Обсуждение.** Обнаружено сходство реактивности клеточных линий эпителиальных клеток собирательного протока нефрона, клеточных элементов селезеночной ткани и эмбриональных фибробластов по отношению к соединению T02, которое отличается наименьшей цитотоксичностью. Соединение T02 также является менее токсичным в отношении энтодермальных (гепатоцитарных) клеток. **Выводы.** По результатам МТТ-теста соединение T02 - наименее цитотоксичное, а поэтому более перспективное для включения в дальнейшие доклинические исследования.

Ключевые слова: цитотоксичность, клеточные линии, SARS-CoV-2, гепатотоксичность, нефротоксичность.

EVALUATION OF THE TOXICITY OF SYNTHESIZED SUBSTANCES - CANDIDATES WITH ANTIVIRAL ACTIVITY AGAINST SARS-CoV-2 ON MODEL CELL LINES

Elizaveta A. Yakovleva¹, Oleg G. Makeev²

^{1,2}Ural state medical university, Yekaterinburg, Russia

¹kepler2202@yandex.ru

Abstract

Introduction. More than 504 million cases of the Novel Coronavirus Infection (COVID-19) have been recorded in the world, the causative agent of which is the SARS-CoV-2 virus. The lack of adequate etiotropic antiviral therapy seems to be a significant problem that research teams of various laboratories are working on, synthesizing compounds that are promising in this regard. Synthesized substances need a comprehensive assessment, as they can have significant side effects mediated by toxicity to various tissues and human organ systems. The fundamental parameter that needs to be evaluated at the stage of development, synthesis, and selection is the in vitro cytotoxicity of promising candidate substances. The optimal method is to evaluate cellular cytotoxicity in a human cell culture model. Purpose of the study. Determination of cellular toxicity of customer-provided replicas of triazavirin codenamed T01, T02, and T03 in a human cell culture model. **Materials and methods.** B2 cell lines were used as model cell cultures. Sp (splenic tissue), LECh 3/81 (human embryonic tissue), MDCK II (kidney tissue), H5 (hepatocytic tissue). The evaluation of the cytotoxic effect was based on vital tests. The cytotoxicity index (IC₅₀) was determined using a colorimetric test by evaluating the metabolic activity of the cells. Statistical data processing was carried out using the Statistica 6.0 software package. **Results.** In relation to the cells of the LEC 3/81 line (human embryonic lungs), the compounds T01 (IC₅₀-0.015491 µg/ml) and T03 (IC₅₀-0.133139 µg/ml) have the highest cytotoxicity, and the lowest cytotoxicity is T02 (IC₅₀ - 3.588634 µg /ml). the results of the study of cell lines B2. Sp and MDCK II are characterized by a similar trend: the cytotoxicity index of T01 and T03 compounds according to IC₅₀ remains relatively high and ranges from 0.017189858 to 0.025085 µg/mL for B2. Sp and IC₅₀ 0.018456 and 0.192311 µg/mL for MDCK II, respectively. At the same time, the corresponding toxicity value of the T02 drug is

again significantly lower than these values (IC₅₀-3.451552 µg/ml and IC₅₀ 4.343635 µg/ml for B2. Sp and MDCK II, respectively). For H5, the IC₅₀ for T03 is 0.190575 µg/mL and 0.190575 for T01 on the one hand, while for the T02 compound it is 0.753665 µg/mL. **Discussion.** Similar reactivity of cell lines of epithelial cells of the collecting duct of the nephron, cell elements of the splenic tissue and embryonic fibroblasts in relation to the T02 compound, which is characterized by the least cytotoxicity, was found. Compound T02 is also less toxic to endodermal (hepatocyte) cells. **Conclusions.** According to the results of the MTT test, the T02 compound is the least cytotoxic, and therefore more promising for inclusion in further preclinical studies.

Keywords: cytotoxicity, cell lines, SARS-CoV-2, hepatotoxicity, nephrotoxicity.

ВВЕДЕНИЕ

На данный момент в мире зафиксировано более 504 млн. случаев заболевания Новой Коронавирусной Инфекцией (COVID-19), возбудителем которой является вирус SARS-CoV-2. Пандемия COVID-19, продолжающаяся уже более двух лет, распространилась по всем континентам, затронула все страны и слои населения. Отсутствие адекватной этиотропной противовирусной терапии [1] представляется значительной проблемой, над которой, тем не менее, трудятся исследовательские коллективы различных лабораторий и профильных учреждений по всему миру [2], разрабатывая и синтезируя перспективные в данном плане соединения. Синтезируемые вещества, однако, нуждаются в комплексной оценке, так как, наряду с адекватной и достаточной противовирусной активностью, могут обладать значимыми побочными эффектами, опосредованными токсичностью в отношении различных тканей и систем органов человеческого организма. Следовательно, основополагающим параметром, нуждающимся в оценке и проверке на этапе разработки, синтеза и отбора, является цитотоксичность перспективных веществ-кандидатов *in vitro*. Оптимальным методом является оценка клеточной цитотоксичности на модели культур клеток человека.

Работа выполнена на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории Уральского Государственного Медицинского Университета, отдела молекулярных и клеточных технологий. Оценке на предмет цитотоксичности подвергались предоставленные заказчиком реплики триазавирина - препараты под кодовым наименованием T01, T02, и T03.

Цель исследования - определение клеточной токсичности предоставленных заказчиком реплик триазавирина на модели культур клеток человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве модельных культур клеток с целью оценки токсичности разработанных химических соединений использованы клеточные линии, любезно предоставленные European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC), ассоциированным членом которого является Уральский государственный медицинский университет (ECCW14007), – B2. Sp (селезеночная ткань), H5 (гепатоцитарная ткань), MDCK II (почечная ткань,

эпителий собирательного протока нефрона). Также были использованы клетки ЛЭЧ 3/81 (ткани эмбриона человека), полученные из ФБУН «Екатеринбургский научно – исследовательский институт вирусных инфекций» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Культивирование клеток проводили в соответствии с рекомендованными протоколам ЕСАСС.

В соответствии с рекомендациями международного Номенклатурного комитета по классификации клеточной смерти [3], оценка цитотоксического эффекта, включая морфологические признаки, основывалась на витальных тестах.

Индекс цитотоксичности (IC₅₀) определяли с использованием колориметрического теста посредством оценки метаболической активности клеток. Метод основан на способности митохондриальных дегидрогеназ живых клеток восстанавливать 3-(4,5-лиметилтиазол-2-ил)-2,5-лифенил-2Н-тетразолиум (МТТ) бромид в формазан, кристаллизующийся внутри клеток. Кристаллы формазана переводят в раствор с помощью органических растворителей и затем измеряют оптическую плотность. В работе использовали тест-систему TOX1 (Sigma Aldrich). Для анализа цитотоксического эффекта клетки высаживали на 96-луночные культуральные планшеты (Sarstedt) в стартовом количестве $5 \cdot 10^3$ клеток на лунку. Культивирование проводили в стандартных условиях при температуре 37°C, концентрации CO₂ – 5% и влажности 95%, в культуральной среде DMEM (SIGMA-ALDRICH)/Ham'sF-12 (MPBiomedicals)/фетальная бычья сыворотка (HyClone, США) в соотношении 6:3:1, соответственно, в инкубаторе (Sanyo, Япония). При достижении клетками конfluenceности 70% вносили исследуемые вещества в широком диапазоне концентраций (от 0,0001 до 5,0 мкг/мл). Через 48 часов полностью удаляли среду с исследуемым агентом. Дальнейший анализ образцов проводили в соответствии с рекомендациями производителя. 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 времени удаляли внесенный раствор и экстрагировали образовавшийся формазан добавлением 100 мкл лизирующего раствора. Оптическую плотность регистрировали на вертикальном спектрофотометре (Multiskan GO ThermoFisher Scientific) с длиной волны 570 и 690 нм.

Получение достоверных данных в каждой группе предусматривало не менее 7 повторностей.

Морфологический анализ исследуемых культур клеток проводили на витальных препаратах.

Статистическую обработку данных проводили в программном пакете Statistica 6.0

РЕЗУЛЬТАТЫ

Полученные результаты приведены в таблице №1.

Таблица 1

Индекс цитотоксичности (IC50) исследуемых веществ на линиях клеток различного происхождения

IC50	Линия клеток	ЛЭЧ 3/81	B2. Sp	MDCK II	H5
T01 мкг/мл	Среднее значение	0.015491	0.017189858	0.018456	0.190575
	доверительный интервал	0.00977- 0.02121215	0.00981- 0.024569715	0.010535499- 0.026376756	0.020706- 0.360444
T02 мкг/мл	Среднее значение	3.588634	3.451552	4.343635	0.753665
	доверительный интервал	2.333495- 4.843773	2.31173- 4.591373	2.422694- 6.264576	0.133019- 1.37431
T03 мкг/мл	Среднее значение	0.133139	0.025085	0.192311	0.008523
	доверительный интервал	0.027949- 0.238328	0.02222- 0.027949	0.110731- 0.273891	0.002142- 0.014904

Примечание: наиболее статистически и физиологически значимые результаты выделены курсивом.

Анализ полученных данных позволяет выявить особенности токсичности исследованных препаратов. Так, в отношении клеток линии ЛЭЧ 3/81 (легкие эмбриона человека) наибольшей цитотоксичностью обладают соединения T01 (IC50-0.015491 мкг/мл) и T03 (IC50-0.133139 мкг/мл), а наименьшей - T02 (IC50 - 3.588634 мкг/мл), значимо выделяясь не менее чем на порядок по сравнению с другими анализируемыми соединениями.

Примечательно, что результаты исследования линий клеток B2. Sp и MDCK II характеризуются сходной направленностью: индекс цитотоксичности соединений T01 и T03 по IC50 остается относительно высоким и находится в пределах от 0.017189858 до 0.025085 мкг/мл для B2. Sp и IC50 0.018456 и 0.192311 мкг/мл для MDCK II соответственно. В то же время соответствующее значение токсичности препарата T02 вновь значимо ниже этих значений (IC50-3.451552 мкг/мл и IC50 4,343635 мкг/мл для B2. Sp и MDCK II соответственно).

Гепатоцитарные клетки (H5), в отличие от других клеточных линий, в отношении разброса индекса цитотоксичности располагаются более компактно. И хотя различия подчас выражены - IC50 для T03 составляет 0.190575 мкг/мл и 0,190575 - для T01 с одной стороны, а у соединения T02 - 0.753665 мкг/мл - с

другой, тем не менее последний показатель отличается от других несколько меньшей токсичностью. Однако эти значения не выходят за пределы 1,37 мкг/мл.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты оставляют возможность не только феноменологической трактовки. Так, в исследовании применены клеточные линии двух зародышевых листков, формирующих эукариотический организм. При этом линии MDCK II, B2. Sp и ЛЭЧ 3/81 имеют мезодермальное происхождение, H5 – энтодермальное.

С этой точки зрения вполне объяснимо сходство реактивности клеточных линий эпителиальных клеток собирательного протока нефрона, клеточных элементов селезеночной ткани и эмбриональных фибробластов по отношению к соединению T02, которое отличается наименьшей цитотоксичностью. Однако соединение T02 также является менее токсичным в отношении энтодермальных (гепатоцитарных) клеток.

Вероятно, выявленные эффекты исследуемых соединений могут быть обусловлены не только свойствами исследуемых соединений, но и особенностями метаболизма клеток различного происхождения, которые сохраняют отличительные черты обмена веществ на протяжении всей жизни организма, а взаимный переход (трансдифференцировка) хотя и возможен, но является сравнительно редким событием.

ВЫВОДЫ

1. Определены индексы цитотоксичности (IC50) на клеточных линиях MDCK II – почечная ткань, эпителий собирательных протоков нефрона, ЛЭЧ 3/81 (ткани эмбриона человека), B2. Sp (селезеночная ткань), H5 (гепатоцитарная ткань) в диапазоне концентраций веществ (от 0,001 до 5 мкг/мл).

2. Результаты МТТ-теста позволяют отобрать среди представленных заказчиком водорастворимых реплик триазавирина T01, T02 и T03, соединение T02 как наименее цитотоксичное, а поэтому более перспективное для включения в дальнейшие доклинические исследования.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Kouznetsov V. V. COVID-19 treatment: Much research and testing, but far, few magic bullets against SARS-CoV-2 coronavirus //European Journal of Medicinal Chemistry. – 2020. – Т. 203. – С. 112647.
2. Cai Q. et al. Experimental treatment with favipiravir for COVID-19: an open-label control study //Engineering. – 2020. – Т. 6. – №. 10. – С. 1192-1198.
3. Nomenclature Committee on Cell Death, Cell Death and Differentiation (2005) 12, 1463–1467 & 2005 Nature Publishing Group

Сведения об авторах

Е.А. Яковлева – студентка

О.Г. Макеев – д. м. н., профессор, главный научный сотрудник отдела молекулярных и клеточных технологий и радиоизотопной лаборатории ЦНИЛ,

УГМУ.

Information about the authors

E.A. Yakovleva - student

O.G. Makeev - Doctor of Medical Sciences, Professor, Chief Researcher of the Department of Molecular and Cellular Technologies and the Radioisotope Laboratory of the Central Scientific Research Laboratory, USMU.