

УДК: 576.08

КОМПЛЕКС АРИЛБИПИРИДИН – ПЛАТИНА (II) ПОДАВЛЯЕТ РОСТ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Юркова Карина Петровна¹, Тохтуева Мария Дмитриевна¹, Абрамов Владислав Михайлович¹, Ельцов Олег Станиславович¹, Мелехин Всеволод Викторович^{1,2}

¹НОИИЦ ХФТ ХТИ

ФГАОУ ВО «УрФУ имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»

²Кафедра биологии и биотехнологий

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России

Екатеринбург, Россия

Аннотация

Введение. В данной работе представлены результаты оценки биологического эффекта комплекса арилбипиридин – платина (II) (арилбипиридин – Pt) и описан его потенциальный механизм противоопухолевого действия, который отличается от механизма препарата цисплатина. Комплекс арилбипиридин – Pt демонстрирует значительную цитотоксичность в отношении клеток глиобластомы, что подтверждено результатами МТТ – теста.

Цель исследования – изучить противоопухолевую активность комплекса арилбипиридин – Pt. **Материал и методы.** Цитотоксичность оценивали *in vitro* с помощью МТТ – теста, основанного на восстановлении тетразолиевого красителя. Индукцию апоптоза анализировали методом Annexin V – FITC, позволяющего детектировать фосфатидилсерин на внешней мембране апоптотических клеток. **Результаты.** Соединение проявляет высокую цитотоксичность в отношении клеточной линии глиобластомы A172, индуцируя ранний апоптоз, а также активность против линии A549 (аденокарцинома легкого). В отличие от цисплатина, соединение характеризуется сниженной цитотоксичностью в отношении неопухолевых клеток, что указывает на его потенциальную безопасность. **Выводы.** Полученные результаты указывают на то, что комплекс арилбипиридин – Pt обладает альтернативным механизмом противоопухолевой активности, что отличает его от классических препаратов платины, взаимодействующих с ДНК. Это открывает новые возможности для разработки комплексов платины с улучшенными свойствами, способными преодолевать такие проблемы, как токсичность и лекарственная устойчивость.

Ключевые слова: комплекс арилбипиридин – платина, глиобластома, цитотоксичность, аденокарцинома легкого.

ARYLBIPYRIDINE – PLATINUM (II) COMPLEX INHIBITS TUMOR CELL GROWTH

Yurkova Karina Petrovna¹, Tokhtueva Maria Dmitrievna¹, Abramov Vladislav Mikhailovich¹, Yeltsov Oleg Stanislavovich¹, Melekhin Vsevolod Viktorovich^{1,2}

¹Research and Educational Center for Chemical and Pharmaceutical Technologies

Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin

²Department of Biology and Biotechnologies

Ural State Medical University

Yekaterinburg, Russia

Abstract

Introduction. This study presents the biological properties of the aryl bipyridine – platinum (II) complex (aryl bipy – Pt) and describes its potential antitumor mechanism of action, which differs from that of the well – known cisplatin. The aryl bipy – Pt complex exhibits significant cytotoxicity against glioblastoma cells, as confirmed by MTT assay results. The aim of this study was to investigate the anti – tumor activity of the aryl bipyridine – platinum (II) complex. **Material and methods.** Cytotoxicity was assessed *in vitro* using the MTT assay based on the reduction of tetrazolium dye. Apoptosis induction was analyzed by Annexin V – FITC staining, which detects phosphatidylserine on the outer membrane of apoptotic cells. **Results.** The compound demonstrated high cytotoxicity against the glioblastoma cell line A172, inducing early apoptosis, as well as activity against the A549 cell line (lung adenocarcinoma). Unlike cisplatin, the compound exhibited reduced cytotoxicity toward normal cells, suggesting its potential safety. **Conclusions.** The obtained results indicate that the aryl bipy – Pt complex possesses an alternative antitumor mechanism, distinguishing it from classical platinum – based drugs that interact with DNA. This opens new possibilities for developing platinum complexes with improved properties capable of overcoming challenges such as toxicity and drug resistance.

Keywords: arylbipyridine – platinum complex, glioblastoma, cytotoxicity, lung adenocarcinoma.

ВВЕДЕНИЕ

Химиотерапевтические препараты на основе платины, такие как цисплатин, карбоплатин и оксалиплатин, широко применяются для лечения злокачественных новообразований. Однако их использование ограничено развитием резистентности и серьезными побочными эффектами, включая нефротоксичность, ототоксичность и

нейротоксичность [1]. Несмотря на это, препараты платины обладают преимуществами, такими как низкая молекулярная масса, что делает их потенциально эффективными для лечения опухолей головного мозга, например, глиобластомы, где средняя выживаемость пациентов составляет около 15 месяцев [2]. Основной механизм действия цисплатина заключается в ковалентном связывании с ДНК, что приводит к нарушению репликации и апоптозу. Однако резистентность опухолевых клеток стимулирует поиск новых соединений с альтернативными механизмами действия. Таким образом, разработка новых комплексов платины с альтернативными механизмами действия остается важным направлением в борьбе с резистентностью и токсичностью существующих препаратов.

Цель исследования – изучить противоопухолевую активность комплекса платины (II) на основе 6 – арил – 2,2' – бипиридина.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили на культивируемых клетках глиобластомы человека (A172, ATCC CRL 1620: T98G, ATCC CRL 1690), карциномы легкого человека (A549, ATCC CCL 185), гепатоцеллюлярной карциномы (HepG2, ATCC HB 8065) и клетках почки эмбриона человека (HEK293, ATCC CRL 1573), полученных из коллекции культур клеток позвоночных Института цитологии РАН (Санкт – Петербург, Россия). Клетки культивировали в среде DMEM/F – 12 (ООО «Биолот» Санкт – Петербург, Россия) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (ООО «Биолот» Санкт – Петербург, Россия) при 37°C, 5% CO₂ и влажности 98%. Для субкультивирования использовали 0,25% раствор трипсина (ООО «Биолот» Санкт – Петербург, Россия) при конфлюентности $\geq 90\%$.

Соединения растворяли в ДМСО, а затем разбавляли культуральной средой DMEM/F – 12 с 10% фетальной бычьей сывороткой (FBS) до конечных концентраций: 0,2, 0,6, 1,8, 5,4, 16,2, 48,6 мкМ. Концентрация ДМСО в конечном растворе не превышала 1%. В качестве препарата сравнения использовали цисплатин. Клетки высевали в 96 – луночные планшеты при концентрации 4×10^3 клеток на лунку. Через 24 часа в лунки добавляли тестируемые соединения в заданных концентрациях и инкубировали в течение 72 часов. После инкубации в культуры добавляли раствор МТТ (20 мкл, 5 мг/мл) и инкубировали еще 2 часа. Затем среду удаляли и добавляли 200 мкл смеси ДМСО и изопропанола (1:1). Оптическую плотность измеряли на планшетном спектрофотометре Victor Nivo™ (PerkinElmer, США) при длине волны 570 нм.

Для оценки раннего апоптоза использовали метод двойного флуоресцентного окрашивания клеток аннексином V – FITC и йодидом пропидия (PI). Клетки высевали в чашки Петри диаметром 35 мм и инкубировали с тестируемыми соединениями в концентрации IC₅₀ в течение 72 часов. После инкубации клетки снимали трипсином 0,25%, осаждали центрифугированием при 200g в течение 5 минут и ресуспендировали в 25 мкл связывающего буфера. К суспензии добавляли по 2,5 мкл аннексина V – FITC и PI, инкубировали в темноте в течение 10 минут и анализировали под флуоресцентным микроскопом.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы RStudio (Version 2022.07.01) и пакета R (version 4.2.1.). Индекс цитотоксичности (IC₅₀) рассчитывали с построением кривых доза – эффект с помощью пакета «drc» [3].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Индекс цитотоксичности IC₅₀ был рассчитан на основе результатов МТТ – теста (Таблица 1). Комплекс платины, синтезированный ранее, продемонстрировал выраженную противоопухолевую активность, особенно в отношении клеток глиобластомы человека линии A172. Как следует из кривых доза – эффект (Рис. 1а), соединение значительно снижает жизнеспособность опухолевых клеток A172 и A549, сохраняя при этом более высокую степень жизнеспособности нормальных клеток (линия HEK293). В то же время цисплатин начинает проявлять токсическое действие на клетки эмбриональной почки человека при более низких концентрациях (Рис. 1б). Поскольку тестируемое соединение показало наибольшую эффективность против клеток глиобластомы (A172), эта линия была выбрана в качестве

основной модели по изучению механизма действия. Также была использована линия T98G, проявившая меньшую чувствительность к исследуемым соединениям.

Таблица 1.

Индекс цитотоксичности ($IC_{50} \pm SE$) исследуемых соединений на клетках линий глиобластомы A172 и T98G, гепатоцеллюлярной карциномы HepG2, карциномы легкого A549 и почки эмбриона человека HEK293, мкМ

Соединения	Клеточные линии				
	A172	T98G	A549	HepG2	HEK293
Соединение 1	8.2 ± 1.5	26.5 ± 3.8	11.4 ± 1.4	24.2 ± 1.9	31.7 ± 3.4
Цисплатин	4.2 ± 0.5	18.6 ± 2.4	24.4 ± 5.4	32.2 ± 5.2	19.5 ± 2.9

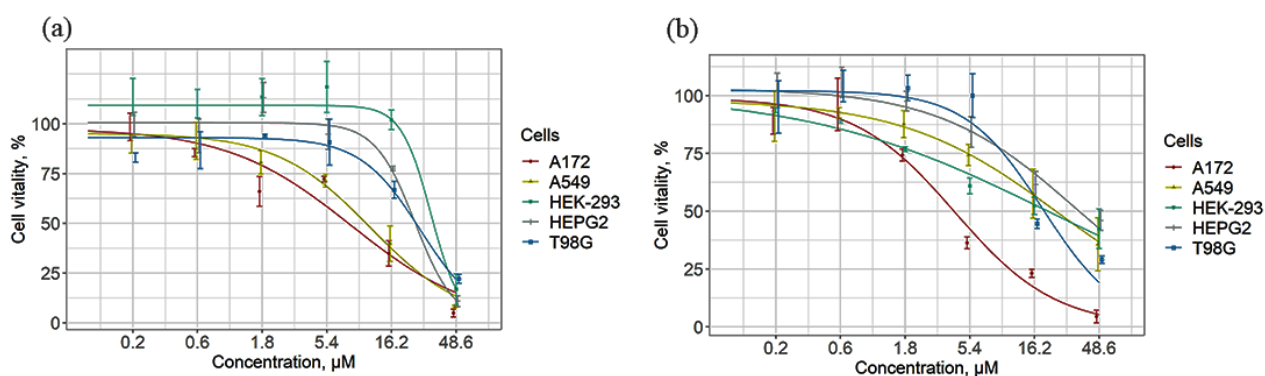


Рис. 1 Кривые зависимости дозы от эффекта для (a) – соединения 1, (b) – цисплатина (среднее значение $\pm$ SD, $n = 3$).

После обработки клеток A172 и T98G смесью флуоресцентных красителей аннексина V – FITC и йодида пропидия (PI) было выявлено, что цисплатин индуцирует ранний апоптоз в 21% клеток линии A172, при этом более 10% клеток были положительными по PI, что может указывать на более поздние стадии апоптотической гибели. Соединение 1 показало менее выраженный эффект: около 11% клеток находились в раннем апоптозе, а 8% клеток имели нарушенную целостность цитоплазматической мембраны и были PI – положительны (Рис. 2a). На линии T98G цисплатин также вызывал апоптоз, индуцируя гибель примерно 31% клеток (положительных по аннексину V – FITC и PI). В то же время соединение 1 не проявляло значительной активности в индукции апоптоза на этой линии (Рис. 2b).

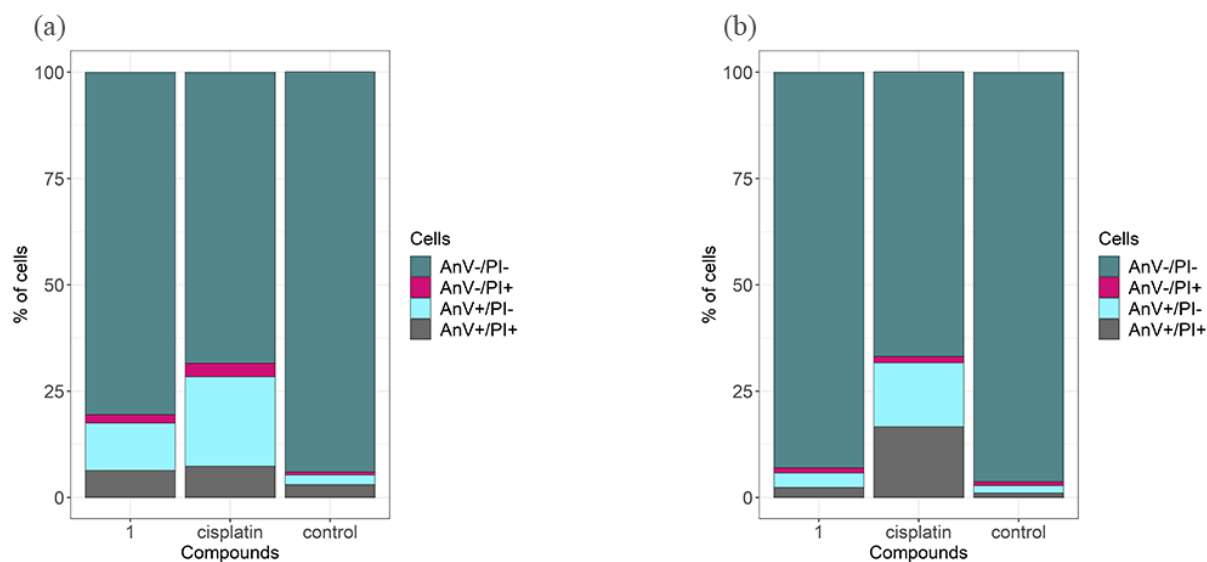


Рис. 2 Процентное соотношение клеток с ранним (AnV+/PI –), поздним (AnV+/PI +) апоптозом и иных погибших (AnV – /PI+) клеток для A172 (a) и T98G (b) линии после 72 – часовой инкубации с соединением 1 и цисплатином в концентрации, равной IC₅₀, для каждого из образцов

ОБСУЖДЕНИЕ

Данные указывают на то, что соединение 1 действует иначе. Хотя оно также снижает репликативную активность клеток, его механизм, по – видимому, не связан с прямым воздействием на ДНК. Это подтверждается результатами микроскопического анализа, где клетки, обработанные соединением 1, демонстрировали выраженный красный флуоресцентный эффект, указывающий на активное деление, в то время как цисплатин практически полностью подавлял этот процесс. Преимущество соединения 1 заключается в его избирательной активности в отношении опухолевых клеток. Наибольшая эффективность соединения наблюдается против клеток глиобластомы A172 (IC₅₀ = 8,2 мкМ), что сопоставимо с действием цисплатина (IC₅₀ = 4.2 мкМ). При этом соединение 1 демонстрирует в 2 раза меньшую токсичность к нормальным клеткам НЕК293 (31.7 мкМ против 19.5 мкМ для цисплатина) (Таблица 1). Кроме того, соединение 1 проявляет более высокую эффективность в отношении аденокарциномы легких A549 (IC₅₀ = 11.4 мкМ) по сравнению с цисплатином (IC₅₀ = 24.4 мкМ) (Рис. 1a). Но соединение 1 проявляет ограниченную активность в отношении клеточной линии глиобластомы T98G, демонстрируя значение IC₅₀ = 26,5 мкМ (Рис. 1a). Цисплатин вызывает ранний апоптоз в 21% клеток A172 и поздние стадии гибели (10% PI+), тогда как соединение 1 преимущественно активирует ранний апоптоз (11%) (Рис. 2a). На T98G соединение 1 не проявляет значимой проапоптотической активности, в отличие от цисплатина (31% гибели) (Рис. 2b).

ВЫВОДЫ

1. Соединение демонстрирует выраженную цитотоксическую активность против клеток глиобластомы A172 (IC₅₀ = 8.2±1.5 мкМ), превосходя цисплатин по селективности действия.
2. В отличие от цисплатина, индуцирующего апоптоз, соединение 1 демонстрирует иной механизм цитотоксического действия: доля AnV – /PI+ клеток (8%) превышает AnV+/PI – популяцию (11%). Преобладание общего уровня клеточной гибели (AnV+/PI+ + AnV – /PI+) свидетельствует о неканоническом механизме действия.
3. Соединение 1 проявляет более высокую активность против A172 (IC₅₀ = 8.2 мкМ), чем против T98G (IC₅₀ = 26.5 мкМ), тогда как цисплатин демонстрирует обратную зависимость (Рис. 2a, Таблица 1)
4. Полученные результаты указывают на перспективность дальнейшего изучения соединения 1 как потенциального противоопухолевого агента.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Чубыкина С.В. Полинейропатия, индуцированная применением препаратов платины у онкологических больных / С.В. Чубыкина, М.Ю. Татарникова, Г.Г. Авакян // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2023. – Т. 123, № 7. – С. 19 – 24.
2. Спивак, М.Д. Современные возможности основных методов лечения мультиформной глиобластомы / М. Д. Спивак // Молодой ученый. – 2018. – № 17 (203). – С. 120 – 123.
3. Dose – response analysis using R / Ritz C., Baty F., Streibig J. C [et al.] // PloS one. – 2015. – Vol. 10. №. 12. – P. e0146021.
4. Вартанян, А.А. Молекулярные механизмы действия препаратов платины / А.А. Вартанян, М.В. Огородникова // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – Т. 3. №. 1. – С. 14–19.
5. Критченков, А.С. Дизайн и противоопухолевая активность комплексных соединений платины / А.С. Критченков, Я.М. Станишевский, Ю.А. Скорик // Химики – фармацевтический журнал. – 2019. – Т. 53. №. 1. – С. 8–16.

Сведения об авторах

К.П. Юркова* – лаборант – исследователь кафедры органической и биомолекулярной химии ХТИ УрФУ, студент
М.Д. Тохтуева – инженер – исследователь лаборатории ПБКиГТ НОиИЦ ХФТ ХТИ УрФУ, аспирант
В.М. Абрамов – инженер лаборатории комплексных исследований и экспертной оценки органических материалов, аспирант
О.С. Ельцов – кандидат химических наук, доцент, заведующий лаборатории комплексных исследований и экспертной оценки органических материалов ЦКП УрФУ
В.В. Мелехин – кандидат медицинских наук, доцент, заведующий лаборатории ПБКиГТ НОиИЦ ХФТ ХТИ УрФУ,

Information about the authors

K.P. Yurkova* – Laboratory researcher at the Department of Organic and Biomolecular Chemistry of the UrFU Institute of Chemistry and Technology, student
M.D. Tokhtueva – Research Engineer of the Laboratory of Primary Bioscreening, Cellular and Gene Technologies of the Scientific, Educational and Innovation Center of the Chemical and Pharmaceutical Technologies, Institute of Chemical Technology, UrFU, Postgraduate student
V.M. Abramov – Postgraduate student of the Department of Organic Synthesis Technology of the Institute of Chemical Technology, UrFU
O.S. Yeltsov – Candidate of Sciences (Chemistry), Associate Professor, Head of the Laboratory of Integrated Research and Expert evaluation of Organic Materials of Center of Shared Use, UrFU
V.V. Melekhin – Candidate of Science (Medicine), Associate Professor, Head of the Laboratory of Primary Bioscreening, Cellular and Gene Technologies

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

karina.iurkova@urfu.me

УДК: 616 – 006 – 085.373:577.112

БЕЛКИ ТЕПЛОВОГО ШОКА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ЛЕЧЕНИИ ОНКОЛОГИИ

Ярмолук Ольга Михайловна, Загретдинова Эльвира Нажмутдиновна, Ванчугова Наталья Николаевна

Кафедра биохимии

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России

Екатеринбург, Россия

Аннотация

Введение. Белки теплового шока (БТШ) представляют собой семейство консервативных молекулярных шаперонов, которые обеспечивают выживание клеток при стрессовых воздействиях. В клетках злокачественных опухолей часто наблюдается повышенная экспрессия БТШ, способствующая прогрессированию рака и устойчивости к терапии. Современные исследования рассматривают БТШ в качестве перспективных мишеней для противоопухолевого лечения – как путем прямого ингибирования их функции, так и с помощью вакцин, нацеленных на индукцию противоопухолевого иммунитета. **Цель исследования** – изучение современного состояния проблемы применения БТШ в онкотерапии и оценка осведомленности будущих врачей о данной тематике. **Материал и методы.** В рамках работы проведен анонимный опрос 65 студентов медицинского вуза (18–25 лет) с использованием авторского вопросника (8 вопросов). **Результаты.** Полученные результаты показали, что менее половины опрошенных были знакомы с понятием БТШ, однако большинство отметили интерес к данной теме и признали потенциал использования БТШ в лечении рака. Обнаружена тенденция увеличения осведомленности о БТШ на старших курсах. **Выводы.** Практическое значение работы заключается в обосновании необходимости интеграции современных молекулярно – биологических достижений (таких как БТШ) в образовательные программы и подтверждении перспективности новых подходов к терапии онкологических заболеваний.

Ключевые слова: белки теплового шока, онкотерапия, осведомленность, анкета, противоопухолевое лечение.