УДК 615.015.35

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ АГЕНТОВ ДЛЯ БОРНЕЙТРОНЗАХВАТНОЙ ТЕРАПИИ

Балданшириева А.Д.[1], Мелехин В.В.[1,3], Смышляева Л.А.[2], Губина О.Г.[1]

[1]ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России, Отдел молекулярных и клеточных технологий и радиоизотопная лаборатория ЦНИЛ, г. Екатеринбург
[2]ФГАОУ ВО «УрФУ имени первого президента России Б.Н.Ельцина», г. Екатеринбург
ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий, г. Екатеринбург

В данной статье рассматриваются особенности потенциальных препаратов для борнейтронзахватной терапии онкологических заболеваний. Проведена оценка цитотоксической активности борсодержащих образцов на культуре клеток глиобластомы человека с последующим вычислением индекса цитототоксичности. После анализа полученных данных были выбраны наиболее перспективные препараты для дальнейших исследований.

Ключевые слова: борнейтронзахватная терапия, клеточная линия глиобластомы человека, цитотоксичность

Evaluation of cytotoxic effects of potential agents for boron neutron capture therapy

Baldanshirieva A.D[1], Melekhin V.V[1,3], Smyshliaeva L.A. [2], Gubina O.G.[1]

[1]Ural state medical university
[2]Ural federal university
[3]Institute of Medical Cell Technologies
Ekaterinburg

The article deals the results of studies of in vitro cytotoxicity of boron containing compounds on the human glioblastoma cells. It has been shown the minimal toxic concentrations for each agent for using cell lines. After data analysis the most perspective substance was chosen for further researches.

Keywords: boron neutron capture therapy, human glioblastoma cells, cytotoxicity

Введение

Онкологические заболевания занимают лидирующие позиции в структуре смертности населения России и всего мира. Ежегодно диагностируют свыше десяти миллионов случаев первичных заболеваний. Данные обстоятельства обуславливают необходимость создания новых методов для лечения онкологических заболеваний, которые бы обеспечили

направленное разрушение опухоли без ущерба для окружающих клеток и тканей. Такой эффект достигается при помощи борнейтронзахватной терапии.

Клинический интерес данного метода заключается в лечении преимущественно мультиформных глиобластом и злокачественной меланомы. Поскольку борнейтронзахватная терапия является таргетной, существует потенциал для уничтожения опухолевых клеток, если в них будет доставлено достаточное количество ^{10}B и тепловых нейтронов [1].

Сущность метода заключается во введении в организм вещества, содержащего стабильный изотоп ^{10}B, преимущественно in situ. За счет транспортных молекул вещество избирательно накапливается в клетках опухолей. После чего опухоль локально облучают нейтронным пучком, и стабильный изотоп ^{10}B переходит в возбужденное состояние ^{11}B. Благодаря быстрому снятию возбуждения образовавшегося ядра около 80% энергии выделяется внутрь опухолевой клетки, происходит ее разрушение [2].

Основными требованиями к препаратам для борнейтронзахватной терапии являются возможность избирательного накопления бора в клетках опухоли, низкая токсичность и растворимость в воде. В настоящее время нет препарата, который бы отвечал всем требованиям. Но современные методы синтеза позволяют создавать большое количество веществ, которые могут стать потенциальными агентами для доставки бора. Так как спектр веществ значителен, для анализа борсодержащих молекул используются культивируемые клетки человека. В первую очередь с целью определения цитотоксичности веществ, а также выбора концентраций для проведения исследований по накоплению веществ в опухолевой культуре клеток [2].

Цель работы - определить цитотоксичность веществ для борнейтронзахватной терапии

Материалы и методы исследования

В работе была использована культура клеток глиобластомы человека, полученная по оригинальной методике. Для исследования был взят фрагмент опухоли, полученный после радикальной операции, от пациента 43 лет с разрешения локального этического комитета.

Образцы борсодержащих препаратов GL-63, GL-153, GL-155 были синтезированы на кафедре Органической и Биомолекулярной химии Химико-Технологического Института УРФУ.

Данные агенты представляют собой низкомолекулярные соединения, относящиеся к классу карборанов. Имеют свойство растворяться в воде, этилацетате, бензоле, ДМСО и ацетоне.

Вещества перед исследованием предварительно растворяли в культуральной среде DMEM/HAM F12, которая используется при работе с клеточными линиями.

Цитотоксическую активность определяли с использованием колориметрического теста для оценки метаболической активности клеток. Данный метод основан на способности митохондриальных дегидрогеназ живых клеток восстанавливать 3-(4,5-лиметилтиазол-2-ил)-2,5-лифенил-2H-тетразолиум (MTT) бромид в формазан, который кристаллизуется внутри клеток. Кристаллы формазана переводят в раствор с помощью органических растворителей и затем измеряют оптическую плотность как экспериментальных, так и контрольной группы [1]. В работе использовали тест систему TOX1 (Sigma Aldrich). Для анализа цитотоксического эффекта культуру клеток высаживали на 96-луночные культуральные планшеты (Sarstedt). Культивирование производили при температуре 37 ^{0}C, концентрации CO_2 – 5% и влажности 95%, в среде DMEM/HAM F12 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Sigma Aldrich) в инкубаторе (Sanyo, Япония) [3]. При достижении клетками конфлюентности 70% вносили исследуемые вещества в концентрации от 100 до 300 мМ на сутки. Через 24 часа полностью удаляли среду с исследуемым агентом. Дальнейший анализ образцов производился в соответствие с рекомендациями производителя. В лунки вносили 200 мкл ростовой среды с 10% содержанием готового раствора для проведения MTT теста, культивирование производили в тех же условиях в течение 4 часов. По истечению времени 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 – IC_{50} – определяли методом простой линейной регрессии. Данные принимали как достоверные при значении $p<0.05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Оценка цитотоксического эффекта исследуемых образцов основывается на анализе метаболической активности клеточной культуры, а выживаемость определяется как сохранение метаболизма после прекращения действия веществ.

IC_{50} представляет собой концентрацию вещества, при которой процент жизнеспособных клеток составляет половину от данных в контрольной группе [1].

При анализе зависимости жизнеспособности клеток от используемых концентраций было установлено, что увеличение концентрации вещества сопровождается уменьшением числа жизнеспособных клеток.

По результатам исследования наиболее низкой цитотоксической активностью обладает вещество GL-63, при внесении веществ в концентрации 200 мМ, количество жизнеспособных клеток составляло 85 % для препарата GL-63, 45% для GL-153 и 22% для GL-155 (рис.).

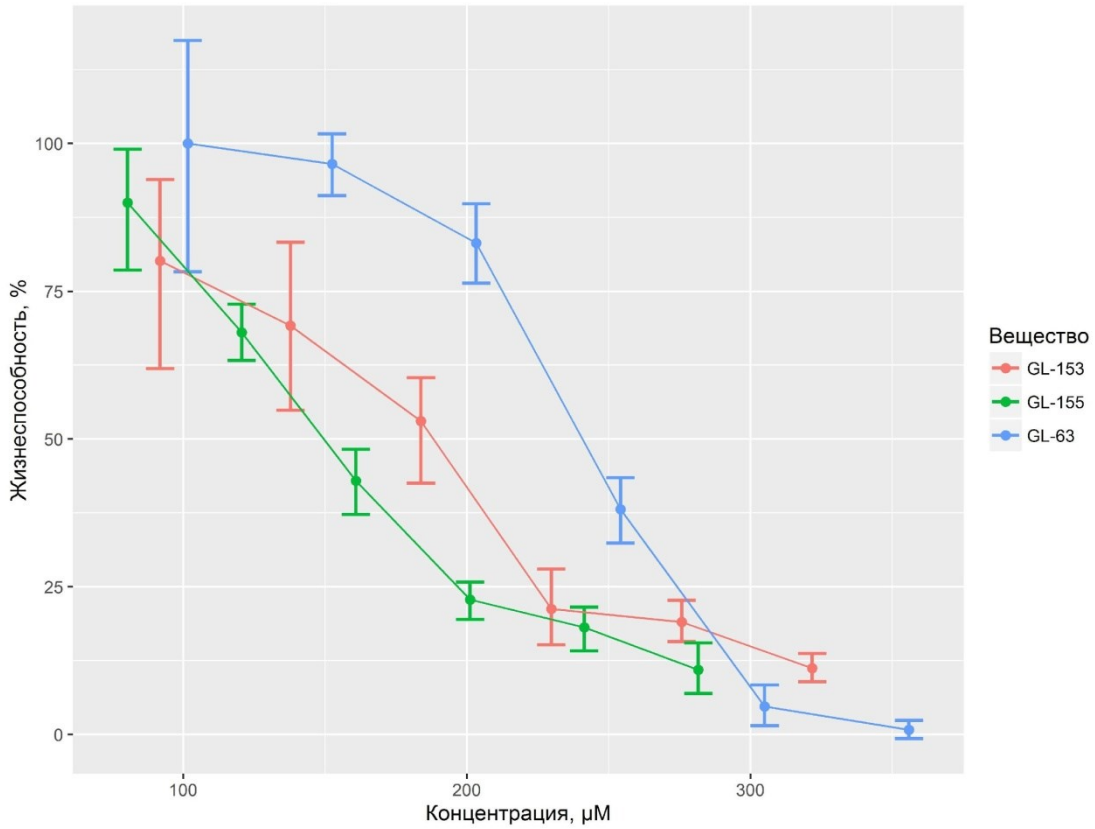


Рис. Определение IC_{50} для исследуемых веществ

Установлено, что IC_{50} образца GL-63 составляет 237,71 мМ, что сопоставимо с данными по цитотоксичности, опубликованными в более ранних исследованиях зарубежных ученых, для образцов класса карборанов (см. рис.)[1].

IC_{50} для потенциальных агентов GL-153 и GL-155 составляет 183,47 и 161,47 мМ. Что свидетельствует о большем цитотоксическом действии данных веществ по сравнению с образцом GL-63 (см. рис.).

Такой эффект связан с нарушениями метаболической активности клеток, которые проявляются на различных стадиях повреждении клеток. В частности, фаза необратимых изменений сопровождается набуханием митохондрий, денатурацией белков, потерей способности к производству АТФ. Эта стадия характеризуется потерей митохондриального трансмембранного потенциала, полной проницаемостью наружной митохондриальной

мембраны. Митохондрии являются основным звеном, интегрирующим сигналы, регулирующие процесс клеточной гибели. Открытие митохондриальных пор приводит к выходу из митохондрий цитохрома С, эндонуклеаз и апоптогенных белков [4].

Рекомендуется использовать вещества GL-63 и GL-153 для дальнейшего исследования по накоплению бора в клеточной культуре глиобластомы человека с целью отбора наиболее перспективного препарата для проведения борнейтронзахватной терапии.

Выводы

Проведенное исследование перспективных агентов для доставки бора позволило определить минимальную цитотоксическую дозу и выявить наиболее безопасное вещество среди исследуемых образцов.

Выявлено, что вещество GL-63 является менее токсичным по отношению к препаратам GL-153 и GL-155. Токсическое действие препаратов, вероятнее всего, связано с особенностями строения молекул и, в частности, реакционно способных радикалов, отвечающих за избирательное проникновение и накопление этих препаратов в клетках опухолевых новообразований.

С помощью исследования метаболической активности культур после воздействия препаратов определены IC_{50} для исследуемых образцов. Наибольший индекс цитотоксичности имеет вещество GL-63 – 237,71 мМ, что делает исследуемый образец более перспективным для дальнейшего изучения.

Полученные данные позволяют экстраполировать выявленные закономерности при планировании эксперимента по оценке накопления данных веществ в культуре клеток глиобластомы человека с последующим их облучением.

Список литературы

1. Fillipa F. da Silva A., Raquel S.G.R. Seixas, Artur M.S. Silva e.t.c. Synthesis, characterization and biological evaluation of carboranylmethylbenzo[b]acridones as novel agents for boron neutron capture therapy //Organic & Biomolecular Chemistry – 2014. V.12, No 28. – P.5201-5211

2. Coderre J.A., Turcotte J.C., Riley K.J. e.t.c. Boron neutron capture therapy: cellular targeting of high linear energy transfer radiation //Technology in Cancer Research & Treatment. – 2003. V. 2, No 5. – P. 1-21.

3. Фрешни Р.Я. Культура животных клеток. Практическое руководство; пер. 5-го англ.изд. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. – 691 с.

4. Цыган В.Н., Камилова Т.А., Скальный А.В. и др. Патофизиология клетки. – СПб.: ЭЛБИ-СПб, 2014 – 128с.

Балданшириева Александра Дугаровна – студентка 4 курса педиатрического факультета, оператор клеточных технологий Отдела молекулярных и клеточных технологий и радиоизотопная лаборатория ЦНИЛ, ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России, 620028г. Екатеринбург, ул. Ключевская,17, тел.: +79995102349, baldanshirieva@mail.ru