

ОТЧЕТ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ИСПЫТАНИЯ ПРЕПАРАТА «СИНТЕЗИТ» НА IN VITRO КЛЕТОЧНЫХ МОДЕЛЯХ

Введение

«Синтезит» - это препарат, полученный на основе соединений железа и используемый в качестве биологически активного вещества. Проведенные ранее *in vivo* исследования на животных показали, что «Синтезит» способствует повышению активности, улучшению общего физиологического состояния экспериментальных животных и не имеет побочных эффектов, однако возможное влияние активного вещества на клетки человека остается неизвестным. В связи с этим целью данного исследования стало разностороннее изучение влияния «Синтезита» на нормальные и опухолевые клетки человека, а именно изучение возможной цитотоксичности, а также про- и противовоспалительных эффектов.

Методы исследования

Для исследований были взяты нормальные (постнатальные фибробласты кожи человека, далее - ПФЧ) и опухолевые линии (HCT116 - колоректальная карцинома человека / рак кишечника; A549 - аденокарцинома лёгких человека / рак легких), а также миелоидные клетки Thp1, использовавшиеся в качестве модели воспаления. Влияние «Синтезита» на жизнеспособность клеток было изучено с помощью МТТ-теста (подробное описание см. далее). Воспалительный эффект препарата оценивался по экспрессии цитокинов методом полимеразной цепной реакции.

Результаты

Была проведена сравнительная оценка цитотоксичности препарата «Синтезит» на жизнеспособность нормальных и опухолевых клеток. Чтобы выявить «терапевтическое окно» использования препарата, нами были взяты дозы, значительно превышающие концентрацию препарата при клиническом применении. При использовании менее 0,025 мг/мл препарата не выявлено влияния на выживаемость фибробластов. При концентрации 0,025-0,05 мг/мл препарат обладает незначительной токсичностью – уровень выживаемости клеток составляет около 80%. При дальнейшем повышении дозы до 0.1-0.5 мг/мл жизнеспособность фибробластов снижается на 30-40% (Рис.1). Все исследованные дозы препарата не оказывают влияния на морфологию фибробластов (Рис.2). На основании представленных данных, препарат «Синтезит» безопасен для фибробластов ПФЧ даже в концентрациях, значительно превышающих терапевтические дозы.

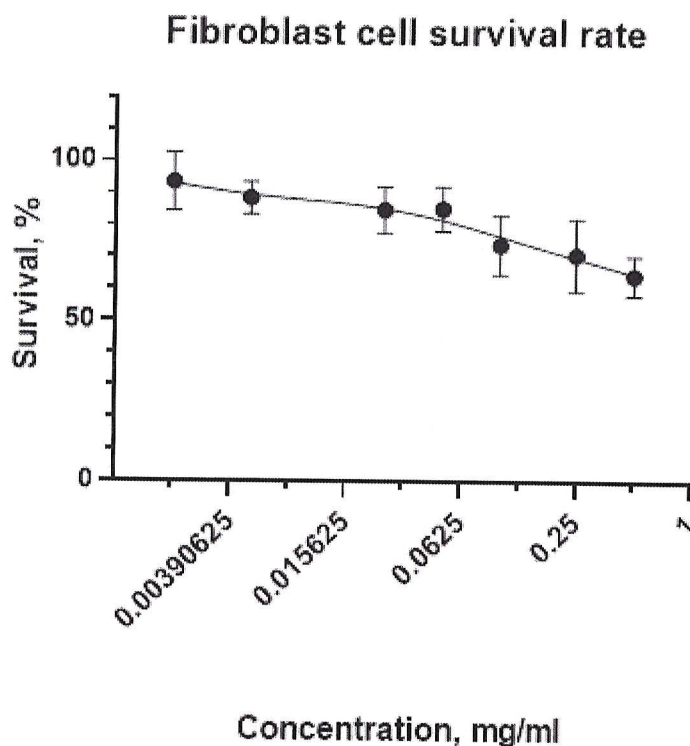


Рис.1. Кривая выживаемости фибробластов кожи человека при действии исследуемого соединения. Показано среднее ($\pm$ стандартное отклонение) по 3 независимым экспериментам.

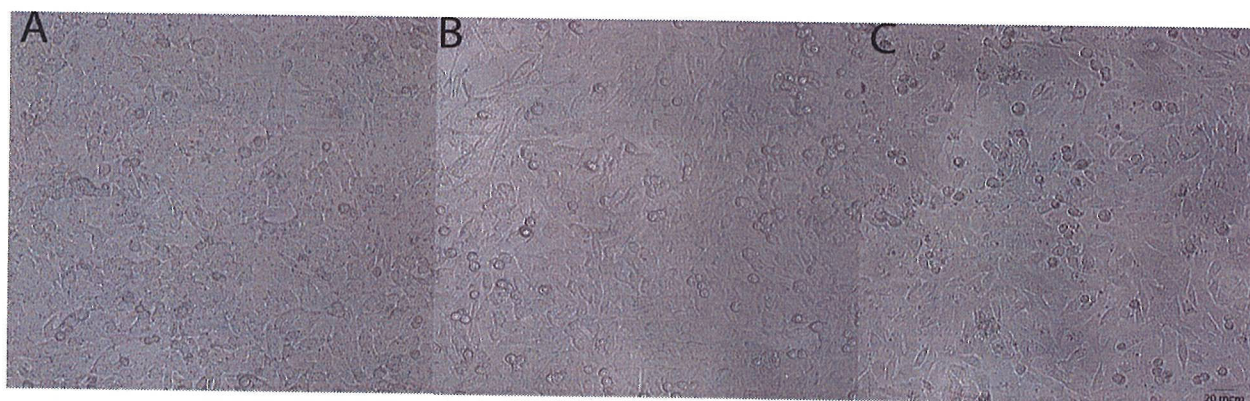


Рис.2. Морфология фибробластов под действием препарата. А. Клетки без препарата (контроль). В-С. Клетки, инкубированные 48 ч с 0.025 мг/мл (В) и 0.05 мг/мл (С) «Синтезита».

Далее, влияние препарата «Синтезит» было исследовано на линиях клеток HCT116 и A549 — классических моделей для изучения рака кишечника и рака лёгких, соответственно. Препарат показал сходные эффекты в обеих выбранных системах. Препарат не обладает цитотоксической активностью по отношению к клеткам HCT116 и A549 в концентрациях до 0.05 мг/мл включительно. При повышении концентрации до 0.1 мг/мл жизнеспособность обеих популяций снижается приблизительно на 30%. При максимальной исследованной

нами дозе (0.5 мг/мл) наблюдается значительный уровень гибели клеток, достигающий около 85% по сравнению с контролем (Рис.3-6).

Важно отметить, что сравнительный анализ действия препарата на нормальные и опухолевые клетки человека показывает, что опухолевые клетки значительно более чувствительны к максимальным дозам препарата, по сравнению с нормальными. Наши данные показывают, что при концентрации 0.5 мг/мл выживают 60% фибробластов, в то время как только 16% HCT116 и 12% A549 оказываются жизнеспособными. Мы предполагаем, что объяснение этого феномена лежит в большей подверженности опухолевых клеток окислительному стрессу, вызываемому препаратами.

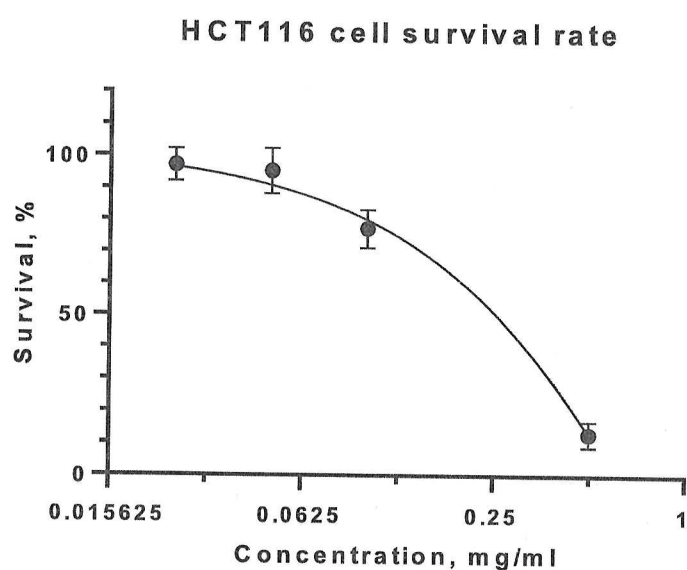


Рис.3. Кривая выживаемости клеток колоректальной карциномы HCT116 при действии исследуемого соединения. Показано среднее ($\pm$ стандартное отклонение) по 3 независимым экспериментам.

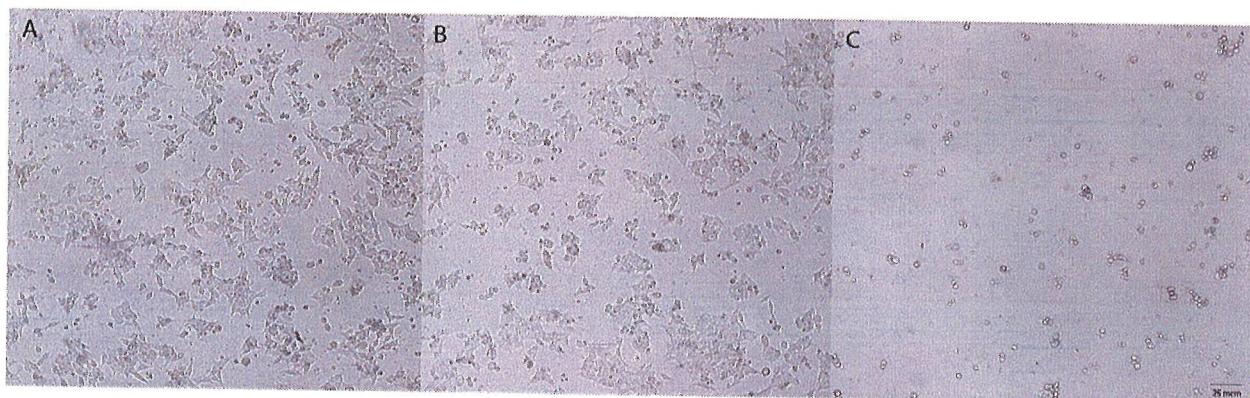


Рис.4. Морфология клеток НСТ116 под действием препарата. А. Клетки без препарата (контроль). В-С. Клетки, инкубированные 48 ч с 0.025 мг/мл (В) и 0.05 мг/мл (С) «Синтезита».

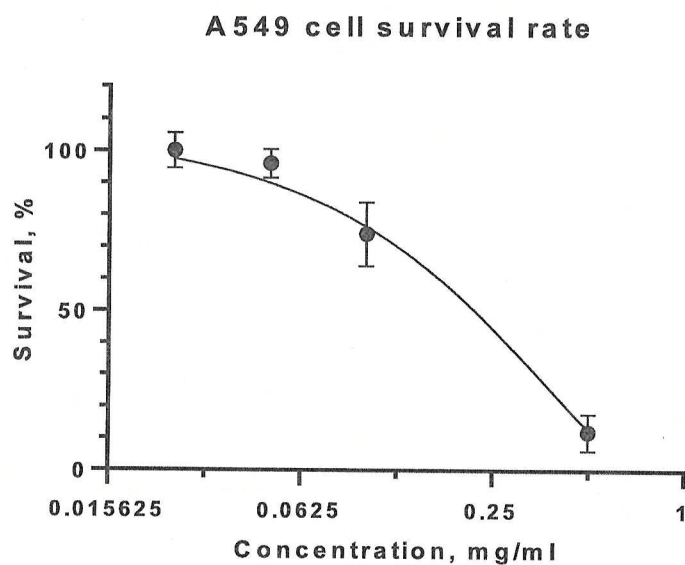


Рис.5. Кривая выживаемости клеток аденокарциномы легких A549 при действии исследуемого соединения. Показано среднее ($\pm$ стандартное отклонение) по 3 независимым экспериментам.

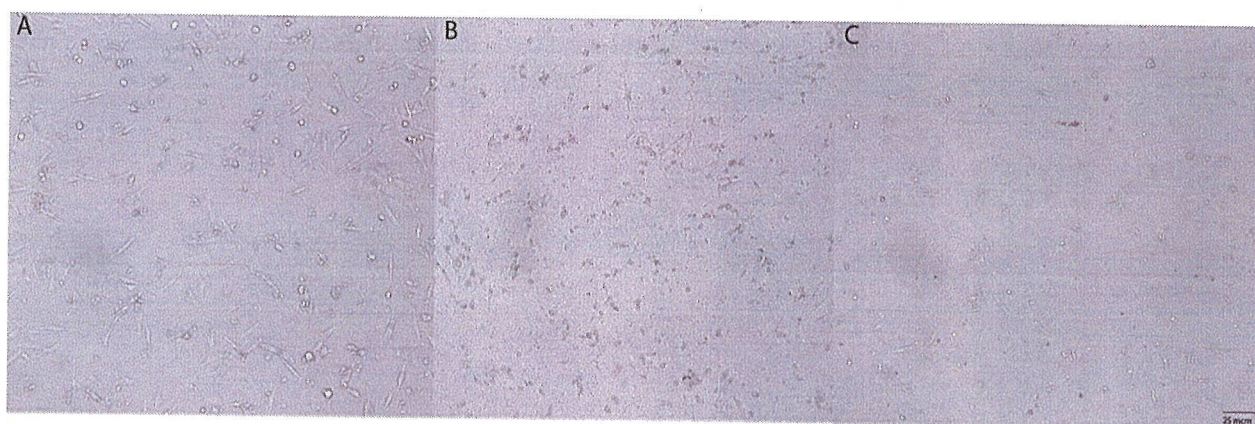


Рис.6. Морфология клеток A549 под действием препарата. А. Клетки без препарата (контроль). В-С. Клетки, инкубированные 48 ч с 0.025 мг/мл (В) и 0.05 мг/мл (С) «Синтезита».

Для изучения возможного провоспалительного эффекта Synthesit моноцитоподобные клетки линии Thp1, характеризующиеся продукцией про- и противовоспалительных цитокинов, были инкубированы в присутствии препарата в течение 24 ч. Было обнаружено, что препарат снижает выработку цитокинов IL1b, IL6 и CCL2, выбранных для анализа (Рис. 7). Таким образом, Synthesit может потенциально обладать противовоспалительным эффектом.

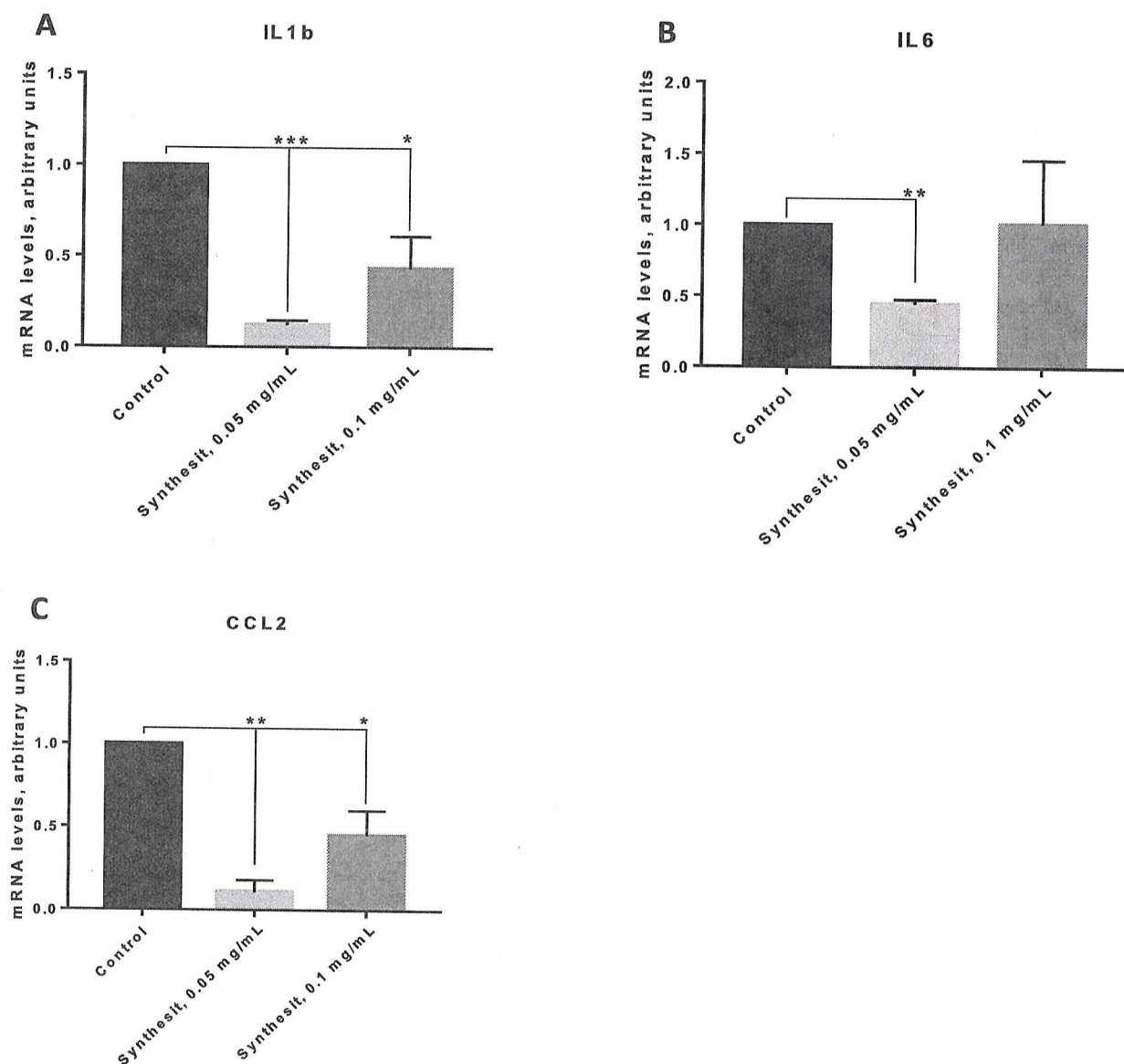


Рис.7. Влияние препарата на провоспалительную активность моноцитоподобных клеток линии Thp1. Цитокины интерлейкин 1 бета (IL1b, А), интерлейкин 6 (IL6, Б) и хемокин CCL2 (С) являются важными медиаторами воспалительного ответа при инфекциях, онкологических и аутоиммунных заболеваниях.

ПРОТОКОЛЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ РАБОТЫ

1. ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ПРЕПАРАТА «СИНТЕЗИТ» НА КУЛЬТУРЕ ПОСТНАТАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА

Культивируемая клеточная линия

Для экспериментов была использована линия постнатальных фибробластов человека (ПФЧ). Клетки ПФЧ культивировали в среде DMEM (БиолоТ) с добавлением следующих компонентов до конечных концентраций: 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS, HyClone) и 10 мкг/мл гентамицина (БиолоТ) (далее: культуральная среда). Инкубация проводилась при 37°C, 5% CO₂ в увлажненной атмосфере. В экспериментах использованы клетки в логарифмической фазе роста.

Препараты для исследований

Для исследования получено 1 соединение. Соединение растворяли в 1х фосфатном буфере (PBS) до конечной концентрации стокового раствора 5 мг/мл.

МТТ-тест для исследования цитотоксичности

Цитотоксическое действие соединений исследовали с помощью МТТ-тесте (по восстановлению желтой соли 3-4,5-диметилтиазол-2-ил-2,5-дифенилтетразола в темно-синий кристаллический формазан митохондриями живых клеток). По результатам исследования цитотоксичности построены кривые выживаемости и определены значения IC₅₀.

Клетки рассевали в лунки 96-луночного планшета (Eppendorf) в количестве 5000 клеток в 200 мкл культуральной среды на лунку, инкубировали 24 часа при 37 °C, 5% CO₂, в увлажненной атмосфере. Затем, среду заменяли на свежую среду, содержащую серийные разведения препарата из исходного раствора, а именно от 0,5 до 0,02 мг/мл. Каждая концентрация была воспроизведена в трех повторностях в двух независимых биологических экспериментах. Контролем в эксперименте служили клетки без препарата (интактные).

Клетки инкубировали 72 ч при 37°C, 5% CO₂, в увлажненной атмосфере. Соединения имеют интенсивную желтую окраску. В связи с этим, перед внесением раствора МТТ лунки отмывали свежей средой. За 1 ч до окончания инкубации в лунки вносили по 20 мкл водного раствора МТТ (5 мг/мл, ПанЭко, Россия). После окончания инкубации культуральную

среду отбирали, клетки ресуспендировали в 200 мкл ДМСО и измеряли оптическую плотность раствора на планшетном спектрофотометре Tecan Infinite F50 при длине волны 570 нм. Процент клеток, выживших при действии каждой дозы соединения, подсчитывали как частное от деления средней оптической плотности в лунках после инкубации с данной дозой к средней оптической плотности контрольных лунок (значения последних приняты за 100%). Результаты представлены на рис. 1 и 2.

2. ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ПРЕПАРАТА «СИНТЕЗИТ» НА КУЛЬТУРАХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК НСТ116 И А549

Культивируемые клеточные линии

Для экспериментов использованы линии НСТ116 (колоректальная карцинома человека) и А549 (аденокарцинома лёгких человека). Клетки культивировали в среде DMEM с добавлением 5% FBS и 100 мкг/мл гентамицина (ПанЭко, Россия) (далее культуральная среда) до конечных концентраций. Инкубация проводилась при 37°C, 5% CO₂ в увлажненной атмосфере. В экспериментах использованы клетки в логарифмической фазе роста.

Материалы для исследований

Для исследований использовался предоставленный препарат «Синтезит» в виде порошка, который был разведён в стоковой концентрации 5 мг/мл в 1х фосфатном буфере (PBS).

МТТ-тест для исследования цитотоксичности

Цитотоксическое действие соединений исследовали в МТТ-тесте (по восстановлению желтой соли 3-4,5-диметилтиазол-2-ил-2,5-дифенилтераразола в темно-синий кристаллический формазан митохондриями живых клеток). По результатам исследования цитотоксичности построены кривые выживаемости со стандартными отклонениями.

Клетки рассевали в лунки 96-луночного планшета (Eppendorf, США) (5000 клеток в 180 мкл культуральной среды), инкубировали 24 часа при 37°C, 5% CO₂, в увлажненной атмосфере. Вносили по 20 мкл раствора исследуемых веществ в культуральной среде, приготовленных серийными разведениями из исходного раствора, конечные концентрации брали от 0.5 до 0.025 мг/мл.

Контролем в эксперименте служили клетки без добавления препарата - интактные.

Через соответствующее время после инкубации (72 часа) отбирали по 20 мкл среды и вносили 20 мкл 10-кратного раствора МТТ, оставляя на 1,5 часа в клеточном инкубаторе. После окончания инкубации культуральную среду отбирали, клетки ресуспендировали в 200 мкл ДМСО и измеряли оптическую плотность раствора на планшетном спектрофотометре Infinite F50 (Tecan, США) при длине волны 570 нм. Оптическая плотность раствора прямо пропорциональна количеству живых клеток. Процент клеток, выживших при действии каждой дозы соединения, подсчитывали как частное от деления средней оптической плотности в лунках после инкубации с данной дозой к средней оптической плотности контрольных лунок (100% выживаемости). Результаты представлены на Рис. 3-6. По оси Y на каждом графике представлена выживаемость в %.

3. ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУНОГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТА «СИНТЕЗИТ» НА КУЛЬТУРАХ МОНОЦИТОПОДОБНЫХ КЛЕТОК THP1

Культивируемые клеточные линии

Для экспериментов использованы линии THP1 (моноцитоподобные клетки человека) и. Клетки культивировали в среде RPMI с добавлением 5% FBS и 100 мкг/мл гентамицина (ПанЭко, Россия) (далее культуральная среда) до конечных концентраций. Инкубация проводилась при 37°C, 5% CO₂ в увлажненной атмосфере. В экспериментах использованы клетки в логарифмической фазе роста.

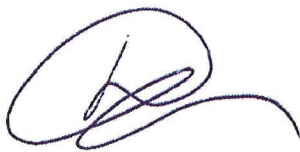
Материалы для исследований

Для исследований использовался предоставленный препарат «Синтезит» в виде порошка, который был разведён в стоковой концентрации 5 мг/мл в 1х фосфатном буфере (PBS).

Анализ генной экспрессии провоспалительных цитокинов

Клетки рассевали в лунки 6-луночного планшета (Eppendorf, США) с концентрацией 1 млн. клеток в лунке. Полимеразная цепная реакция настоящего времени (ПЦР) проводилась с использованием интеркалирующей флюоресцентной пробы (SYBR-Green, Евроген). Праймеры к CCL2, IL-1 β , IL-6, HSP90 (Евроген) были подобраны с использованием приложения NCBI Primer-BLAST. HSP90 был использован в качестве референсного гена. Для определения уровня экспрессии генов измерения проводились на CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System (BioRad Laboratories). Результаты представлены на Рис. 7.

Отчет подготовлен:

A handwritten signature in blue ink, consisting of a large loop followed by a series of smaller, fluid strokes.

Духинова М.С.

01.10.2020

кандидат биологических наук