

3. Shirinov 3.G. and dr-Surgical treatment of diseases of the operated stomach. Surgery, 2005,6.37.
4. Kushi NM and others. Resection of the stomach with the formation of the anastomosis of Roux. Surgery, 2006.3-4.
5. Khozhimvtov G.M. Rakhimov B.S.-Surgical treatment of peptic ulcers of anastomosis after gastrectomy. Uzbekistan Surgeons, 2006,3,26.
6. Chartakov KC. The effect of gastric resection on the lymphatic system. Journal of Theoretical and Clinical Medicine 2006.

УДК 615.015.35

**Балданшириева А.Д., Мелехин В.В., Смышляева Л.А., Макеев О.Г.
ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ПЕРСПЕКТИВНЫХ
МОЛЕКУЛ ДЛЯ БОРНЕЙТРОНЗАХВАТНОЙ ТЕРАПИИ**

Кафедра медицинской биологии и генетики
Уральский государственный медицинский университет
Лаборатория технологий генной и клеточной терапии
ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий
Уральский Федеральный университет
Екатеринбург, Российская Федерация

**Baldanshirieva A.D., Melekhin V.V., Smyshlyayeva L.A., Makeev O.G.
IN VITRO EVALUATION OF CYTOTOXICITY OF POTENTIAL AGENTS
FOR BORON NEUTRON CAPTURE THERAPY**

Department of medical biology and genetics
Ural State Medical University
Institute of Medical Cell Technologies
Ural Federal University
Yekaterinburg, Russian Federation

E-mail: larim@mail.ru

Аннотация. В статье приводятся результаты оценки цитотоксичности борсодержащих веществ на культивируемые клетки глиобластомы человека. Также описаны минимальные токсические концентрации для данных образцов.

Annotation. The article deals the results of cytotoxicity activity of boron containing compounds on the human glioma cells. Described the minimal toxic concentrations for these agents.

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

Key words: neutron capture therapy, culture of human glioblastoma, MTT-test

Введение

Борнейтронзахватная терапия (БНЗТ) является инновационным методом лечения раковых опухолей, преимущественно глиобластом и меланом. В основе лежит идея взаимодействия ядра ^{10}B и теплового нейтрона. Захват теплового нейтрона ядром ^{10}B сопровождается образованием ядра ^{11}B в возбужденном состоянии, которое мгновенно распадается с образованием ^7Li и ^4He с выделением энергии в ткани на расстояние менее 10 мкм. При этом разрушаются опухолевые клетки с минимальным повреждением окружающих тканей [3].

Все борсодержащие препараты должны избирательно накапливаться в опухолевых клетках, обладать низкой токсичностью и достаточной растворимостью в воде. В настоящее время данным требованиям соответствуют лишь два препарата (борфенилаланин и боркапнат), которые в России не производятся. Однако современные методы химического синтеза позволяют создавать спектр веществ – потенциальных агентов для доставки бора. Так как линейка веществ может быть значительной, необходимо проводить предварительный скрининг веществ с целью определения их токсичности. Наиболее эффективным методом определения токсичности потенциальных агентов терапии считаются исследования на клеточных культурах человека [3].

Цель исследования – провести анализ токсичности перспективных агентов для БНЗТ.

Материалы и методы исследования

Для проведения работы использовали культуры клеток глиобластомы трех человек, полученные методом механической и ферментативной дезагрегации по оригинальному протоколу из фрагмента опухоли, после прохождения локального этического комитета.

Потенциальные агенты для борнейтронзахватной терапии GL-63, GL-153, GL-155 были синтезированы на базе Химико-Технологического Института УРФУ.

Данные вещества являются низкомолекулярными соединениями из класса карборанов, синтезированных в нидо форме. Поэтому обладают хорошей растворимостью в воде, этилацетате, бензоле, ДМСО и ацетоне.

Предварительно все вещества растворяли в среде DMEM/НАМ F12, используемой для работы с клеточными культурами.

Цитотоксичность веществ определяли с использованием МТТ-теста, суть которого заключается в восстановлении 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум (МТТ) бромида в формазан посредством митохондриальных НАДН-дегидрогеназ живых клеток. После кристаллизации формазана клетки разрушают с помощью органических растворителей, переводят в раствор и измеряют оптическую плотность как экспериментальных, так и контрольной группы [1]. В работе использовали тест систему TOX1 (Sigma Aldrich).

Для изучения цитотоксичности исследуемых веществ производили посев клеток глиобластомы человека на 96-луночные культуральные планшеты (Sarstedt). Культивирование производили при температуре 37 °С, концентрации CO₂ – 5% и влажности 95%, в среде DMEM/HAM F12 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Sigma Aldrich) в инкубаторе (Sanyo, Япония) [3]. При покрытии клетками 80% площади культурального флакона вносили исследуемые вещества в концентрации от 100 до 300 мкМ на 24 часа. Спустя 24 часа полностью удаляли среду с внесенными агентами. Последующие действия производили в соответствии с рекомендациями производителя набора. В каждую лунку добавляли ростовую среду с 10-% содержанием готового раствора для проведения МТТ теста, затем культуральные планшеты инкубировали в течение 4 часов. По истечении времени полностью удаляли внесенный раствор и разрушали клеточные мембраны добавлением 100 мкл лизирующего раствора для экстракции формазана. Оптическую плотность регистрировали на вертикальном спектрофотометре (Multiskan GO Thermo Scientific, США) 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 исследования и их обсуждение

Данные МТТ-теста позволяют оценить цитотоксический эффект исследуемых образцов. IC₅₀ 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 полученным данным наиболее низкой цитотоксической активностью обладает вещество GL-63, при концентрации вещества 200 мкМ количество жизнеспособных клеток для данного агента составляло 85 %, что значительно превосходит таковые результаты для остальных веществ (45% для GL-153 и 22% для GL-155) (см. рис.1). Вещества GL-153 и GL-155 обладают большим цитотоксическим действием в отличие от образца GL-63 (IC₅₀ = 237,7 мкМ). IC₅₀ для потенциальных агентов составляет 183,2 и 161,4 мкМ соответственно (см. рис.1).

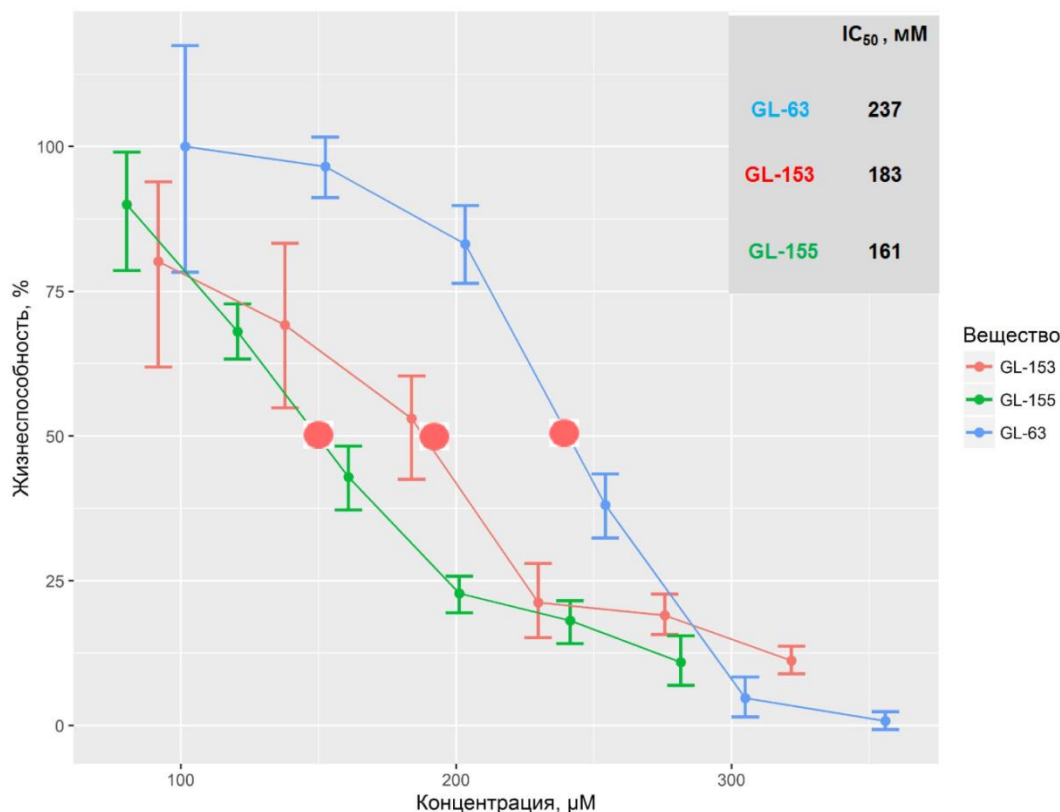


Рис.1 Определение IC₅₀ для исследуемых веществ

Данное действие обусловлено нарушением метаболической активности клеток, проявляющееся при повреждении клеток на разных стадиях. Например, для фазы необратимых изменений характерна денатурация белков, нарушение воспроизводства АТФ и набухание митохондрий. На этой стадии наблюдается повышенная проницаемость наружной митохондриальной мембраны вследствие нарушения митохондриального трансмембранного потенциала. Открытие митохондриальных пор приводит к выходу из митохондрий цитохрома С, эндонуклеаз и апоптогенных белков, являющихся пусковыми факторами клеточной гибели [2].

Полученные результаты были сопоставлены с опубликованными ранее данными зарубежных исследователей по цитотоксичности образцов класса карборанов. Данные вещества являются представителями класса карборанов 3-го поколения, синтезированных в клозо-форме, что обуславливает плохую растворимость в воде. Индекс цитотоксичности наиболее токсичного вещества был равен 20 μM, наименее токсичные агенты имели IC₅₀ более 160 μM. Из представленных данных следует, что вещества GL-63, GL-153 и GL-155 являются менее токсичными по отношению к аналогам. При этом они остаются более токсичными по отношению к борфенилаланину, который показал допустимый уровень токсического эффекта в клинических испытаниях

Однако необходимо отметить, что борфенилаланин содержит меньшее количество бора в молекуле, поэтому его накопление в высоких концентрациях внутри клетки может соответствовать накоплению небольшого количества вещества класса карборанов по процентному содержанию бора в клетке. Этот

факт позволяет предположить использование веществ GL-63, GL-153 и GL-155 при соответствии прочим требованиям к агентам БНЗТ [4].

Также исследуемые борсодержащие образцы уступают ранее изученному веществу GL-57, IC_{50} которого составило 306 μ M. Что может быть связано с наличием в структуре образца GL-57 реакционно способного радикала – этоксикарбонила.

Выводы:

1. В результате проведенного исследования борсодержащих агентов были определены минимальные цитотоксические дозы и установлено наиболее безопасное вещество.
2. Наименьшим цитотоксическим эффектом обладает борсодержащий агент GL-63. Токсическое действие препаратов GL-153 и GL-155, возможно обусловлено молекулярной структурой веществ, наличием реакционно способных радикалов, способствующих избирательному проникновению и накоплению данных агентов в опухолевых клетках.
3. Однако все исследованные вещества уступают синтезированному ранее образцу GL-57 ($IC_{50} = 306 \mu$ M), который на данный момент является наиболее перспективным борсодержащим образцом.

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

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. Патофизиология клетки / В.Н. Цыган, Т.А. Камилова, А.В. Скальный. – СПб.: ЭЛБИ-СПб, 2014 – 128с.
3. Яруллина А.И. Лечение опухолей головного мозга методом бор-нейтронзахватной терапии: трудности и современные решения / А.И. Яруллина, В.В. Каныгин, А.И. Кичигин, М.Г. Жданова, Р.А. Мухамадияров, С.Ю. Таскаев // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2015. – №4. – С.6-10.
4. Faiao-Flores F., Coelho P.R.P., Muniz R.O.R., Souza G.S., Arruda-Neto J., Durvanei A. M. Antitumor potential induction and free radicals production in melanoma cells by Boron Neutron Capture Therapy // Applied radiation and isotopes – 2011. V.64. – P.1748 – 1751.

УДК 616.01/-099

Бурматова А.Ю., Мещанинов В.Н.

**ВЛИЯНИЕ ИММОБИЛИЗАЦИОННОГО ОСТЕОПОРОЗА НА ОБМЕН
МИНЕРАЛОВ ПРИ ИМПЛАНТАЦИИ СПИЦ С АЛМАЗОПОДОБНЫМ
НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫМ ПОКРЫТИЕМ В КОСТНУЮ ТКАНЬ**

ГБУЗ СО «ЦСВМП «УИТО им. В.Д. Чаклина»