

ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА ПРОСТАНОИДОВ ГРУППЫ «В» НА КЛЕТКАХ ЛИНИИ K562

М. С. Чумаченко

Заболеваемость лейкозами входит в десятку наиболее распространенных онкологических заболеваний в Беларуси. Наряду с уже использующимися в медицинской практике целевыми препаратами для борьбы с лейкозами актуальным является поиск биологически активных молекул, обладающих цитотоксическим действием на опухолевые клетки.

Мало изученными являются недавно синтезированные простаноиды группы В: КУ-3, КУ-4. Учитывая многообразие проявляемых биологических эффектов простаноидов в организме, исследование наличия цитотоксического эффекта данных соединений на клетки хронического миелоидного лейкоза представляло большой интерес.

Цель работы: провести исследование цитотоксических эффектов простаноидов группы В: КУ-3, КУ-4 на клетках миелобластомы человека K562.

Материалы и методы. Исследования выполнены на клетках эритробластного криза хронического миелоидного лейкоза человека линии K562, которые культивировали в полноценной среде RPMI-1640 [1, с. 970]. Для тестирования использовали синтезированные в ИБОХ НАН РБ простаноиды группы В: КУ-3, КУ-4. В экспериментах были использованы простаноиды в концентрациях 1×10^{-9} – 1×10^{-4} моль/л. Оценку антипролиферативного и цитостатического эффекта, а также LC_{50} препаратов проводили по исключению трипанового синего. На протяжении исследования цитотоксичность данных препаратов оценивалась по выходу лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в среду, что являлось показателем нарушения целостности цитоплазматической мембраны клетки [2, с. 387]. Так же производились измерения выхода кислой фосфатазы (КФ) в среду культивирования, что означало нарушение целостности лизосом и лизис клетки [3, с. 495]. Контролем служили клетки, культивируемые без добавления простаноидов. Измерения производили в среде культивирования через 24, 48, 72, 96 часов в присутствии препаратов.

Результаты и обсуждение. Определение активности ЛДГ в среде культивирования позволило установить, что максимальный выход ЛДГ при всех тестируемых концентрациях в среду отмечался при культивировании на протяжении 48 часов в присутствии простаноидов КУ-3, КУ-4. На рисунке 1 видно, что наблюдалось увеличение выхода фермента под действием простаноидов более чем в 2 раза при концентрации 1×10^{-4} моль/л при действии как простаноида КУ-3, так и КУ-4. Так же наблюдалась тенденция проявления несколько большей цитотоксической активности КУ-3 по сравнению с КУ-4 при более низких концентраци-

ях ($1 \times 10^{-9} - 1 \times 10^{-7}$ моль/л), в то время как КУ-4 значительно стимулировал выход ЛДГ в среду при концентрация $1 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-4}$ моль/л. При культивировании в течение 24 часов достоверный эффект проявлял лишь простаноид КУ-4 увеличивая выход ЛДГ на 51, 84 и 141 % при концентрациях $1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-4}$ моль/л соответственно.

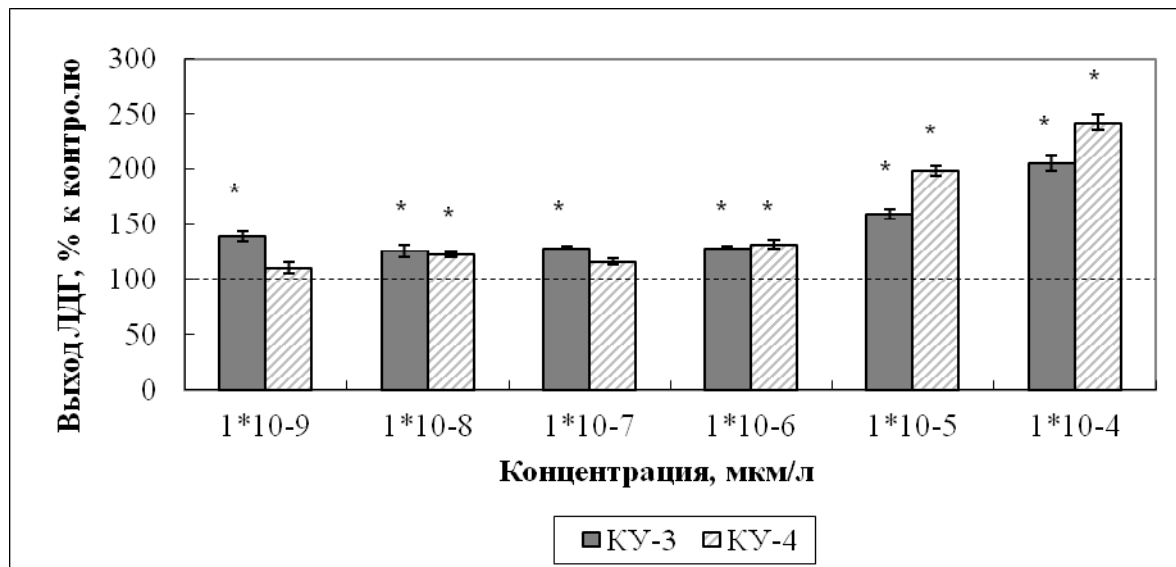


Рис. 1. Изменение активности ЛДГ в среде после 48 часов культивирования в присутствии простаноидов КУ-3, КУ-4, в зависимости от концентрации
Контроль – клетки К 562 без добавления препаратов (пунктирная линия)

При дальнейшем культивировании на протяжении 72 часов мы наблюдали сходный эффект – простаноид КУ-4 проявлял большую цитотоксическую активности при концентрациях $1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-4}$ моль/л по сравнению с КУ-3.

Однако при наиболее длительном времени культивирования в течение 96 часов простаноид КУ-3 показывал большее повреждение цитоплазматической мембраны. Мы наблюдали увеличение выхода ЛДГ в 1,3 раза при 1×10^{-8} моль/л относительно контроля до 3,4 раза при максимальной концентрации препарата. В тоже время как простаноид КУ-4 достоверно не влиял на выход ЛДГ при концентрациях $1 \times 10^{-9} - 1 \times 10^{-6}$ моль/л (выход фермента в пределах 10 %, относительно контроля). Это свидетельствует о пролонгированном действии простаноида КУ-3, который проявляет свое действие после более длительного культивирования.

При оценке выхода КФ под действием простаноидов следует отметить отсутствие четких корреляций при культивировании в течение 24-72 часов. Однако при всех временных промежутках выход КФ под действие КУ-4 был выше по сравнению с простаноидом КУ-3. Это может свидетельствовать о более глубоком повреждении клеток под действием данного простаноида. Максимальный выход КФ отмечался при культивировании в течение 96 часов в присутствии простаноидов (рис.2). При

концентрации 1×10^{-8} моль/л выход КФ в среду культивирования увеличился в 1,2 раза по отношению к контролю для КУ-4. При увеличении концентрации исследуемых препаратов наблюдалось увеличение утечки фермента в среду. При концентрации 1×10^{-4} моль/л выход КФ увеличился в 2,1 и 3,4 раза для препаратов КУ-3, КУ-4 соответственно.

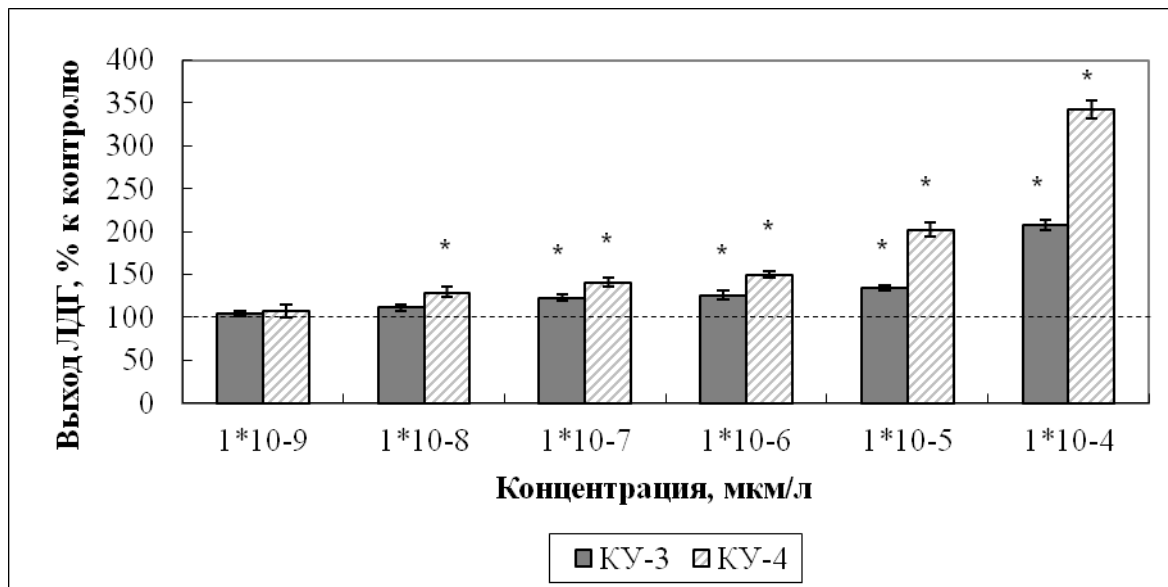


Рис. 2. Изменение активности КФ в среде после 96 часов культивирования в присутствии простаноидов КУ-3, КУ-4, в зависимости от концентрации

Контроль – клетки К 562 без добавления препаратов (пунктирная линия)

Результаты тестирования жизнеспособности клеток миелобластомы человека К562 в тесте с трипановым синим использованы для расчета LC_{50} исследуемых препаратов.

Полученные полулетальные концентрации свидетельствуют о более эффективном цитотоксическом действии простаноида КУ-4 при культивировании в течение 24-72 часов (табл). Простаноид КУ-3 проявляет более пролонгированное действие, показывая высокую цитотоксической активность (в 1,5 раза ниже чем для простаноида КУ-4) при низкой концентрации при культивировании в течение 96 часов.

Таблица

Определение полулетальной концентрации ПГ КУ-3, КУ-4 при культивировании клеток миелобластомы человека К562

Время, часы	LC_{50} (моль/л)	
	ПГ КУ-3	ПГ КУ-4
24	$(1,0 \pm 0,006) \times 10^{-4}$	$(0,95 \pm 0,22) \times 10^{-4}$
48	$(0,80 \pm 0,002) \times 10^{-4}$	$(0,6 \pm 0,020) \times 10^{-4}$
72	$(0,81 \pm 0,03) \times 10^{-4}$	$(0,67 \pm 0,012) \times 10^{-4}$
96	$(0,46 \pm 0,005) \times 10^{-4}$	$(0,69 \pm 0,014) \times 10^{-4}$

Механизмы выявленных цитотоксических эффектов простаноидов представляют интерес для дальнейших исследований.

Литература

1. *Lozzio, C.B., Lozzio, B.B., Feliu, A.S.* Human myeloid cell lines // *Blood*. – 1981. – V. 57, № 5. – P. 979–980.
2. *Weisshaar, D., Grossnoud, E., Faderl, B.* Normbereiche von α -HBDH, LDH, AP und LAP bei Messung mit substrat-optimierten // *Med. Welt*. – 1975. – V. 26, № 9. – P. 387–390
3. *Bergmeyer, H.U., Gawehn, K., Grassl, M.* Phosphatase acid. Methods of enzymatic analysis / H.U. Bergmeyer, K. Gawehn, M. Grassl. – New York: Academic Press, 1974. – P 495.

ПОИСК В ГЕНОМЕ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА МОЛЕКУЛЯРНЫХ МИШЕНЕЙ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ НОВЫХ ПРОТИВОВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ

М. А. Шапиро, М. И. Алейник, А. В. Янцевич

Клещевой энцефалит (КЭ) является одной из самых распространенных и опасных природно-очаговых инфекций лесной зоны умеренных широт. Вирус КЭ способен вызывать у человека острое инфекционное заболевание, характеризующееся лихорадкой, интоксикацией и поражением центральной нервной системы [1,2]. Геном вируса кодирует сравнительно небольшое количество структурных белков и ферментов. Одним из малоизученных ферментов, кодируемых вирусным геномом, является протеазный комплекс NS2B/NS3, состоящий из двух полипептидов и предположительно являющийся сериновой протеазой. Этот ферментативный комплекс участвует в процессинге вирусного полипротеина. В данной работе анализируется молекулярное моделирование структуры белка NS2B, входящего в состав протеазного комплекса NS2B/NS3, а также приведена схема создания экспрессионного вектора.

Цель и задачи

Целью настоящей работы является поиск мишеней для разработки противовирусных препаратов в неструктурной части генома вируса клещевого энцефалита. Для достижения поставленной цели были поставлены следующие задачи:

1. Провести анализ открытых рамок считывания в геноме вируса;