

ПОДАВЛЕНИЕ РОСТА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ГИБРИДНЫМИ НАНОСТРУКТУРАМИ, ВКЛЮЧАЮЩИМИ ПРОИЗВОДНОЕ БЕТУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ

*Терпинская Т.И.¹, Янченко Т.Л.¹, Радченко А.В.², Полукошко Е.Ф.¹,
Артемов М.В.²*

¹*Институт физиологии НАН Беларуси,*

²*Научно-исследовательский институт физико-химических проблем БГУ*

Актуальность. Бетулин и бетулиновая кислота, как и ряд их структурных аналогов, проявляют ингибирующее действие в отношении различных типов опухолевых клеток [1]. В то же время гидрофобность этих соединений обуславливает их слабую растворимость [2] и низкую биодоступность, ограничивая практическое применение. Это диктует необходимость разработки стратегий для усиления биологического действия и улучшения лекарственных свойств таких препаратов. Одним из подходов для достижения этого является использование наноносителей, которые призваны обеспечить гидрофильность, стабильность в биологических средах и доставку активного вещества к целевым тканям и клеткам.

Цель. Исследование *in vitro* противоопухолевого действия гибридных наноструктур, включающих наночастицы типа «ядро-оболочка» и производное бетулиновой кислоты.

Методы исследования. Клетки: глиома С6 (крыса).

Наночастицы: полупроводниковые флуоресцентные наночастицы (квантовые точки) CdSe/ZnS, покрытые оболочкой из амфифильного полимера (НЧ), а также конъюгаты этих НЧ с производным бетулиновой кислоты (НЧБет). Квантовые точки являются яркими стабильными флуорофорами, флуоресцируя в видимом спектре, что позволяет использовать их для визуализации процессов взаимодействия наноструктур с клетками. В опытах были использованы НЧ и НЧБет с сильно отрицательным, близким к нейтральному, умеренно положительным и сильно положительным дзета-потенциалом.

Проведение экспериментов.

Клетки глиомы С6 высевали в лунки культуральных планшетов, вносили Бет в конечной концентрации 0,06 – 16 μM , НЧ или НЧБет в конечной концентрации 0,02 μM . Через 48 ч инкубации при 37°C и 5% CO₂ исследовали жизнеспособность и пролиферативную активность клеток, а также интенсивность связывания с НЧ и НЧБет. Для оценки некротической и апоптотической гибели клетки окрашивали 7-аминоактиномицином Д (Sigma) и флуоресцентно-меченым аннексином V (BD Horizon V500, BD Biosciences), для оценки аутофагии – красителем CYTO-ID Autophagy Detection Kit, Enzo Life Sciences (Enzo Biochem), для оценки распределения клеток по фазам клеточного цикла – 4',6-диамиидно-2-фенилиндолом, для оценки пролиферативной

активности – флуоросферами FLOW-COUNT™ (Beckman Coulter) согласно рекомендациям производителей. Пробы анализировали методом проточной цитометрии с помощью цитофлуориметра BD FACS Canto II с программным обеспечением Diva 7.0 (Becton Dickinson). Готовили препараты типа давленная капля или анализировали монослой клеток с использованием микроскопа ЛЮМ 1 LED (Альтами).

Результаты и их обсуждение. При действии Бет наблюдалось подавление роста клеток глиомы С6, выраженность эффекта зависела от дозы и длительности воздействия. Через 48 ч при концентрации соединения 16 μM клеточный рост был ингибирован в 1,3 раза, а через 72 ч, при концентрации соединения 4 и 16 μM , – в 2,1 – 2,5 раза без подавления жизнеспособности. При дозах 1 μM и ниже эффект был выражен очень слабо или отсутствовал.

Все исследуемые типы НЧ и НЧБет связывались с клетками. Наиболее интенсивно с клетками связывались НЧ с умеренно положительным дзета-потенциалом, наименее интенсивно – с дзета-потенциалом, близким к нейтральному. Конъюгация НЧ с Бет в большинстве случаев усиливала интенсивность их связывания с клетками. Наиболее выраженный эффект характерен для наночастиц с дзета-потенциалом, близким к нейтральному (при этом наблюдалась агрегация конъюгатов вблизи клеток), менее выраженный эффект был характерен для НЧ с отрицательным и умеренно положительным дзета-потенциалом, еще более слабый – для НЧ с высоким положительным дзета-потенциалом.

НЧ с отрицательным, близким к нейтральному и умеренно положительным зарядом проявляли слабую цитотоксичность или были не цитотоксичны. Цитотоксическое действие отмечено для НЧ с высоким положительным зарядом (снижение жизнеспособности на 29% по сравнению с контролем).

Конъюгация с Бет не изменила цитотоксичность наночастиц с высоким положительным зарядом, несколько усилила цитотоксичность наночастиц с умеренно положительным зарядом и существенно повысила цитотоксическую активность наночастиц с зарядом, близким к нейтральному, снижающих жизнеспособность клеток на 90%.

НЧ и НЧБет индуцировали главным образом апоптоз, в меньшей степени – некроз клеток.

НЧ и их конъюгаты с Бет способствовали аутофагии. Интенсивность аутофагии в подавляющем большинстве случаев усиливалась с повышением дзета-потенциала НЧ. Исключение составляли НЧ с близким к нейтральному дзета-потенциалом, которые не вызвали интенсификации аутофагии.

НЧ с сильно положительным или сильно отрицательным дзета-потенциалом проявили антипролиферативное действие, снижая количество клеток в 1,6 и 3 раза. Конъюгация с Бет слабо изменила антипролиферативную активность наноструктур с отрицательным дзета-потенциалом, снизила этот показатель для наноструктур с высоким положительными дзета-потенциалом, значительно усилила – для наноструктур с близким к нейтральному дзета-потенциалом (подавление роста клеток в 3,4 раза) и, в меньшей степени,

с умеренно положительным дзета-потенциалом (подавление роста клеток в 1,3 раза).

Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла показал, что НЧ с высоким положительным дзета-потенциалом способствовали задержке клеток в S-фазе, НЧ с высоким отрицательным и умеренно положительным дзета-потенциалом – в G2/M-фазе. НЧ с потенциалом, близким к нейтральному, существенно не изменяли распределение клеток по фазам клеточного цикла. Конъюгация НЧ с Бет изменяла влияние наноструктур на распределение клеток по фазам клеточного цикла. Конъюгаты НЧБет с дзета-потенциалом, близким к нейтральному, значительно снижали долю клеток в G2/M- и S-фазах и способствовали накоплению клеток в G1/G0-фазе. Конъюгаты НЧБет с отрицательным дзета-потенциалом существенно не изменяли соотношения клеток в различных фазах клеточного цикла. Конъюгаты НЧБет с умеренно и сильно положительным дзета-потенциалом способствовали накоплению клеток в G2/M-фазе. Это свидетельствует о том, что антипролиферативное действие НЧБет с различным дзета-потенциалом может быть обусловлено различными механизмами и/или характеризоваться различной динамикой.

В целом противоопухолевый эффект проявляли НЧ с отрицательным дзета-потенциалом (за счет антипролиферативного действия) и с высоким положительным дзета-потенциалом (за счет цитотоксического и антипролиферативного действия). Все конъюгаты НЧБет также проявляли противоопухолевое действие. НЧБет с отрицательным дзета-потенциалом – за счет подавления пролиферации клеток, остальные типы НЧБет – за счет снижения жизнеспособности и подавления пролиферации.

Таким образом, выраженный противоопухолевый эффект *in vitro* в отношении клеток глиомы С6 через 48 ч наблюдался при концентрации 16 μM Бет. Конъюгаты НЧБет оказывали сходный эффект при концентрации 0,02 μM . Учитывая то, что один конъюгат НЧБет несет около 10 молекул Бет, можно полагать, что противоопухолевый эффект конъюгатов НЧБет в десятки раз превышал действие Бет в свободном виде. В то же время квантовые точки не являются инертными в отношении клеток и также могут вносить вклад в биологический эффект конъюгатов.

Выводы. Противоопухолевый эффект *in vitro* проявляют квантовые точки с сильно отрицательным и сильно положительным дзета-потенциалом, а также конъюгаты квантовых точек с производным бетулиновой кислоты с сильно отрицательным, близким к нейтральному, умеренно положительным и сильно положительным дзета-потенциалом. Отрицательно-заряженные квантовые точки оказывают антипролиферативное действие, все остальные наноструктуры – антипролиферативное и цитотоксическое действие различной степени выраженности.

Конъюгаты квантовых точек и производного бетулиновой кислоты оказывают значительно более выраженный противоопухолевый эффект, чем производное бетулиновой кислоты в свободном виде.

Работа выполнена при поддержке ГПНИ «Химические процессы, реагенты и технологии, биорегуляторы и биооргхимия», задание 2.1.04 НИР 1.

ЛИТЕРАТУРА

1. Multifunctional Roles of Betulinic Acid in Cancer Chemoprevention: Spotlight on JAK/STAT, VEGF, EGF/EGFR, TRAIL/TRAIL-R, AKT/mTOR and Non-Coding RNAs in the Inhibition of Carcinogenesis and Metastasis / A. A. Farooqi [et al.] // *Molecules*. – 2022. – Vol. 28, Issue 1. – Mode of access: <https://doi.org/10.3390/molecules28010067> – Date of access: 28.12.2023.
2. Solubility studies of oleanolic acid and betulinic acid in aqueous solutions and plant extracts of *Viscum album* L / S. Jäger [et al.] // *Planta Med.* – 2007. – Vol. 73, № 2. – P. 157–162.

КЛИНИКО-АНАМНЕСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И ОСОБЕННОСТИ СЕНСИБИЛИЗАЦИИ ДЕТЕЙ С ПИЩЕВОЙ АЛЛЕРГИЕЙ И АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ

Тихон Н.М.¹, Вежель О.В.²

¹Гродненский государственный медицинский университет,

²Гродненская областная детская клиническая больница

Актуальность. Среди аллергических заболеваний в первые годы жизни наиболее часто диагностируется атопический дерматит и пищевая аллергия. Структура пищевой аллергии может различаться в зависимости от региона проживания, а клиническая манифестация и особенности наследственности приобрели новые черты в последние десятилетия.

Цель. Определить особенности клинической манифестации, наследственной предрасположенности, а также возрастные особенности сенсibilизации у детей первых двух лет жизни с атопическим дерматитом и пищевой аллергией на современном этапе.

Методы исследования. В рамках проспективного когортного исследования (2022-2023 г.г.) наблюдается 379 детей. Подгруппа исследования (n=114) – дети, рожденные женщинами, имеющими в анамнезе аллергическое заболевание, подгруппа сравнения (n=265) – дети, рожденные женщинами без аллергического анамнеза. Подгруппа исследования и подгруппа сравнения сопоставимы по полу, данным алергоанамнеза со стороны отца. Отягощенный анамнез по аллергии со стороны отца имели примерно 20% детей, включенных в исследование. Кожные и респираторные формы аллергии у отца ребенка и сиблингов определялись примерно с одинаковой частотой в обеих подгруппах детей. Анализ сенсibilизации проводился *in vitro* с использованием стандартной методики ImmunoCap.