

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Волгоградский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Отчетная работа
по результатам выполнения индивидуальных заданий
производственной практики
по получению профессиональных умений и опыта профессиональной
деятельности
(научно-исследовательская практика)

Тема:

«Экспериментальное изучение цитотоксического действия 5-НТ2А-
антагониста ципрогептадина в сравнении с известным цитостатиком
доксорубицином в МТТ-тесте на культуре клеток аденокарциномы молочной
железы MCF-7»

Выполнила:
студентка 5 курса 3 группы
медико-биологического факультета
специальность 30.05.01 Медицинская биохимия
Иванова Яна Андреевна

Проверил:
*Профессор кафедры фармакологии и биоинформатики,
д.м.н., доцент Яковлев Дмитрий Сергеевич*

Волгоград 2020 г.

Введение. Важной частью доклинического исследования нового лекарственного средства является изучение его влияния на жизнеспособность клеток [1]. Одним из эффективных и показательных тестов на наличие цитотоксического действия у соединений является МТТ-тест [1, 2].

Целесообразным является воспроизведение данной методики в лаборатории кафедры фармакологии и биоинформатики ФГБОУ ВО ВолгГМУ для выявления возможности использовать 5-НТ2А-антагонист ципрогептадин в качестве препарата сравнения в будущих исследованиях новых соединений этого класса на цитотоксичность [3].

Цель работы: изучить цитотоксическое действие 5-НТ2А-антагониста ципрогептадина в сравнении с известным цитостатиком доксорубицином в МТТ-тесте на культуре клеток аденокарциномы молочной железы MCF-7.

Материалы и методы. Исследование проводилось на клетках линии MCF-7 [6]. Использовались реактивы: полная ростовая среда, раствор Хэнкса, 0,25%-й раствор трипсина-ЭДТА, диметилсульфоксид (ДМСО), МТТ (бромид 3-(4,5диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия), 0,4%-й раствор трипанового синего, ципрогептадин, препарат сравнения доксорубицина гидрохлорид, вода деионизированная.

Использовалось оборудование: планшетный ридер, ламинарный бокс, CO₂-инкубатор, инвертированный микроскоп, камера Ньюбауэра.

Цитотоксичность исследуемых веществ была определена с помощью МТТ-теста [3]. После трипсинизации клеточной культуры раствором трипсина-ЭДТА, была приготовлена суспензия клеток концентрацией 5000 кл/мл, затем клетки засеивались в 96-луночный планшет в количестве $1 \cdot 10^3$ кл/200 мкл и культивировались при 37 °С во влажной атмосфере с CO₂ (5%). После 24 часов инкубации была произведена замена культуральной среды на свежую, и к культурам клеток были добавлены по 20 мкл различных концентраций тестируемых соединений (от $1 \cdot 10^{-5}$ до $1 \cdot 10^{-9}$ моль/л), и далее клетки культивировались в тех же условиях 72 часа (контрольные лунки оставлены с

эквивалентным объемом раствора Хэнкса). Каждая концентрация веществ была выполнена в трех повторностях. После инкубации из лунок удаляли среду и добавляли по 100 мкл МТТ-реагента, приготовленного из расчета 5 мг/мл [5], в каждую лунку, инкубировали еще 2ч. По окончании инкубации раствор МТТ аспирировали, и для растворения кристаллов формазана в каждую лунку были добавлены 100 мкл ДМСО, через 10 мин планшет встряхивали 20-45 сек 80-100 об/мин для экстракции формазана. С помощью планшетного ридера определяли оптическую плотность при 530 нм за вычетом измеренного фонового поглощения при 620 нм [6]. Значение концентрации, вызывающее 50 % ингибирование роста популяции клеток (IC₅₀), было определено на основе дозозависимых кривых с использованием GraphPad Prism v.8.0.1 с применением нелинейного регрессионного анализа.

Результаты и их обсуждение. В результате изучения цитотоксического действия с использованием МТТ-теста было выявлено, что IC₅₀ для ципрогептадина - $1,1 \cdot 10^{-6}$ моль/л ($R^2=0,95$), IC₅₀ для препарата сравнения доксорубицина - $1,219 \cdot 10^{-6}$ моль/л ($R^2=0,98$). Полученные данные цитотоксичности исследуемых веществ согласуются с литературными данными [1, 4].

Выводы. Таким образом, анализ данных МТТ-теста показал, что 5-НТ_{2A}-антагонист ципрогептадин достоверно снижал жизнеспособность клеточной культуры MCF-7, но в сравнении с известным цитостатиком доксорубицином степень выраженности цитотоксического действия была меньше.

Литература.

1. Аникина Л.В., Семаков А.В., Пухов С.А., Афанасьева С.В., Ключков С.Г. СРАВНЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ДВУХ АНТРАЦИКЛИНОВЫХ АНТИБИОТИКОВ В ОТНОШЕНИИ НОРМАЛЬНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ ЛИНИЙ КЛЕТОК // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 2
2. Семенова Е. В. и др. Исследование цитотоксичности некоторых синтетических аналогов ресвератрола с помощью МТТ-теста //Материалы XXI научно-практической конференции молодых ученых, аспирантов и студентов Национального исследовательского Мордовского государственного университета им. НП Огарёва. – 2017. – С. 240-244.
3. Яковлев Д. С., Султанова К. Т., Золотова Е. А., Гасайниева А. Г., Спасов А. А. Оптимизация МТТ-теста для определения цитотоксичности новых химических соединений на клеточной линии MCF-7 //Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2020. – С. 58-61.
4. Hsieh H. Y. et al. Ciproheptadine exhibits antitumor activity in urothelial carcinoma cells by targeting GSK3 β to suppress mTOR and β -catenin signaling pathways //Cancer letters. – 2016. – Т. 370. – №. 1. – С. 56-65.
5. Neutral Red versus MTT assay of cell viability in the presence of copper compounds / Mariela G. Perez [et al.] // Analytical Biochemistry. – 2017. – Vol. 535. – P. 43–46.
6. Patel J. Pyrano Fused Coumarins: an Exclusive Synthesis from Simple Micheal Addition of 4-Hydroxy Coumarin to α , β -Unsaturated Carbonyl Compound and Screening of MCF-7 Cell Viability by MTT Assay //Journal of the Solid State Technology. – 2019. – Т. 62. – №. 3. – С. 24-31.