

“SYNTHESIT”产物的测试结果

体外细胞模型报告

引言

Synthesit是从铁化合物获得并用作生物活性物质的产物。以前对动物进行过体内研究已经表明促进活度增加，实验动物的总体生理状况改善而且没有副作用。然而，该活性物质对人体细胞的可能作用尚不清楚。在这方面，这项研究的目的是全面研究Synthesit对正常和肿瘤人类细胞的作用 特别是可能的细胞毒性，以及炎症和抗炎作用。

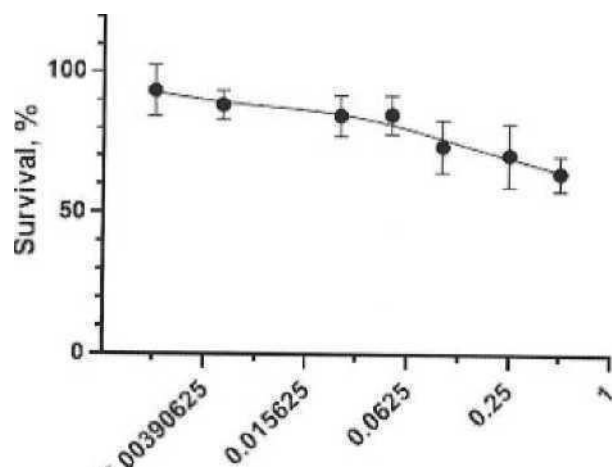
研究方法

正常（产后人类皮肤成纤维细胞，进一步称为PHF）和肿瘤细胞系（HCT116 - 人大肠癌 / 肠癌；A549 - 人肺腺癌 / 肺癌）用于研究，以及用作炎症模型的髓样Thp-1细胞。在MTT试验的帮助下研究了Synthesit对细胞活力的影响（在下面查看更多详细信息）。产物的炎症作用通过细胞因子表达进行评估用于聚合酶链反应法。

结果

Synthesit产物对正常细胞和肿瘤细胞活力的细胞毒性的比较评估已完成。为了确定浓度的“治疗窗口”使用，我们服用的剂量明显超过临床使用中浓度的浓度。当使用小于0.025mg/ml的产物时，对成纤维细胞存活结果没有影响。在0.025-0.05毫克/毫升的浓度下，该产物具有低毒性，细胞数的存活率约为80%。随着剂量进一步增加到0.1-0.5毫克/毫升，成纤维细胞的活力降低了30-40%（图1）。测试的所有产物剂量都不影响成纤维细胞的形态（图2）。根据所提供的数据，Synthesit产物对于PHF的成纤维细胞是安全的，即使浓度显著高于治疗剂量。

成纤维细胞存活率



浓度, 毫克/毫升

图1 研究化合物作用下人皮肤成纤维细胞的存活曲线。示出了3个独立实验数据的平均值（±标准偏差）。

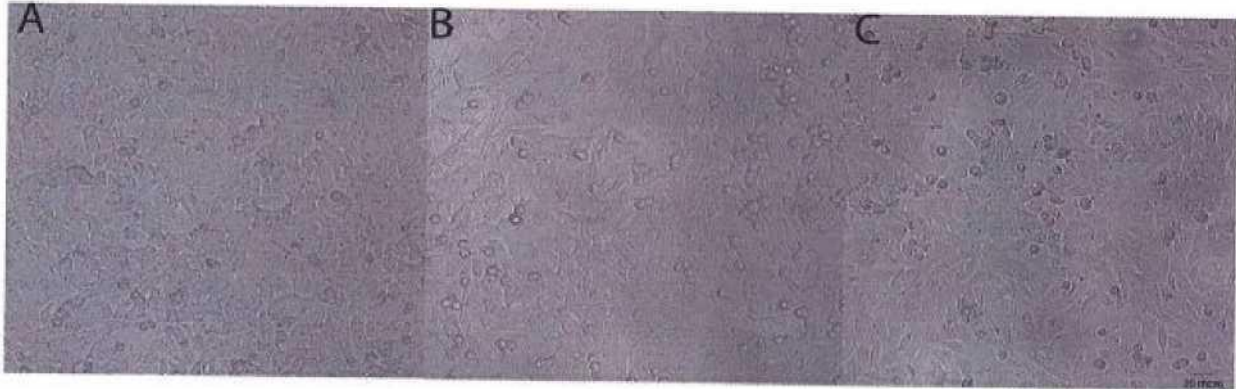


图2。产物作用下成纤维细胞的形态。A。 没有产物的细胞（对照）。

B-C。 细胞与0.025毫克/毫升（B） 和0.05毫克/毫升（C） 的 Synthesit 孵育48小时。

此外，研究了Synthesit产物对细胞系HCT116和A549的影响；用于相应地研究肠癌和肺癌的经典模型。该产物在两个选定的系统中显示出相似的效果。该产物浓度高达0.05毫克/毫升对HCT116和A549细胞没有细胞毒性活性。当浓度增加到0.1毫克/毫升时，两个群体的生存能力都下降了约30%。在0.5毫克/毫升的最大剂量下，观察到显著水平的细胞死亡，与对照数据相比达到约85%（图3-6）。

值得注意的是，产物对正常和人类肿瘤细胞的影响的比较分析表明，与正常相比，肿瘤细胞对产物的最大剂量更敏感。我们的数据显示，在0.5毫克/毫升的浓度下，60%的成纤维细胞存活，而只有16%的HCT116和12%的A549是可行的。我们假设这种现象的解释在于肿瘤细胞更大程度地暴露于由产物引起的氧化应激。

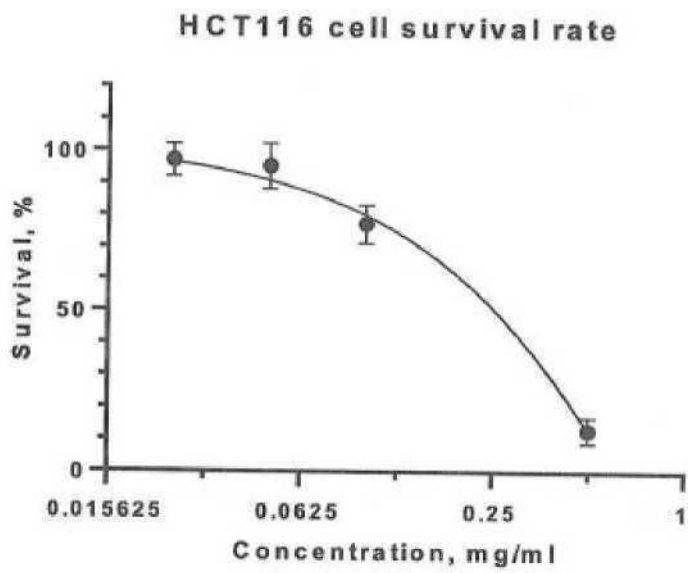


图3。结直肠癌细胞HCT116在所研究化合物作用下的存活曲线。示出了3个独立实验数据的平均值（±标准偏差）。

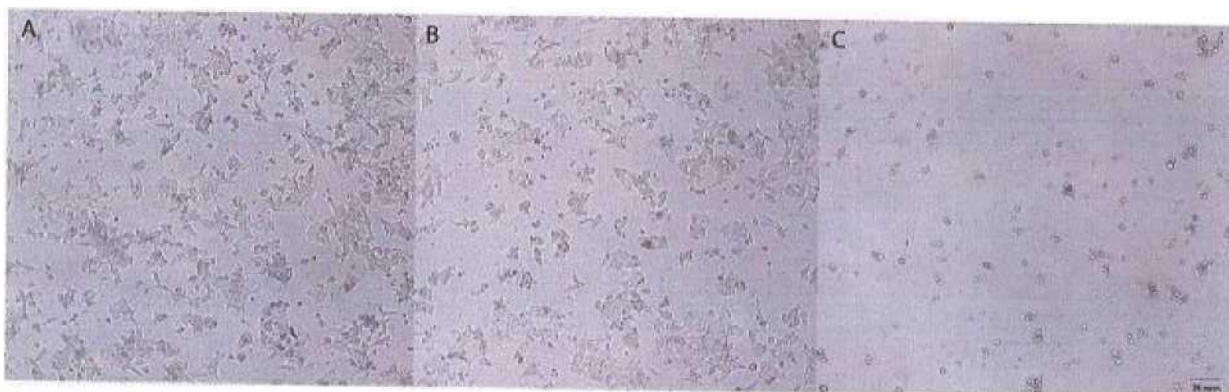
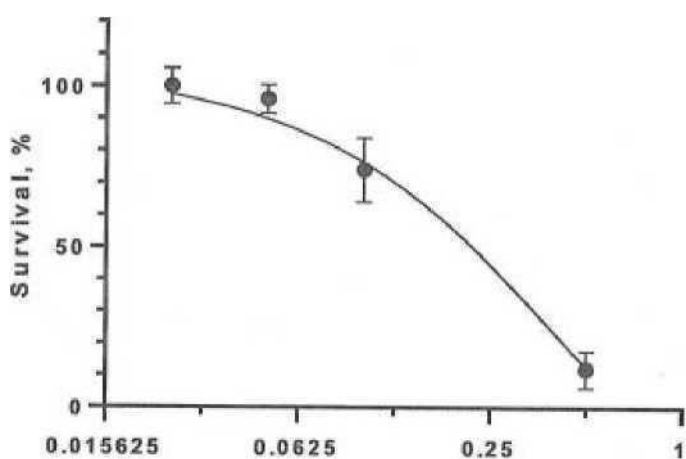


图4。产物作用下的细胞HCT116的形态。A。没有产物的细胞（对照）。B-C。细胞与0.025毫克/毫升（B）和0.05毫克/毫升（C）的 Synthesit 孵育48小时。

A549 细胞存活率



浓度，毫克/毫升

图5。肺腺癌细胞A549在所研究化合物作用下的存活曲线。示出了3个独立实验数据的平均值（±标准偏差）。

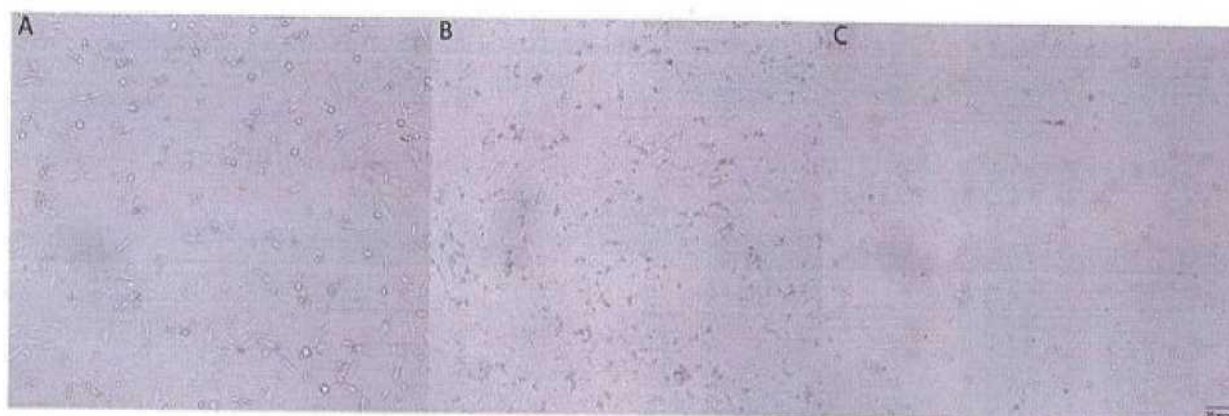


图6。产物作用下的A549细胞的形态。A。没有产物的细胞（对照）。

B-C。 细胞与0.025毫克/毫升（B） 和0.05毫克/毫升（C） 的 Synthesit 孵育48小时。

为了研究Synthesit对以产生促炎和抗炎细胞因子为特征的单核细胞样Thp-1细胞的可能促炎作用，在产物存在下孵育24小时。根据研究，该产物减少了选择用于分析的细胞因子IL1b，IL6和CCL2的产生（图7）。因此Synthesit可以潜在地具有抗炎作用。

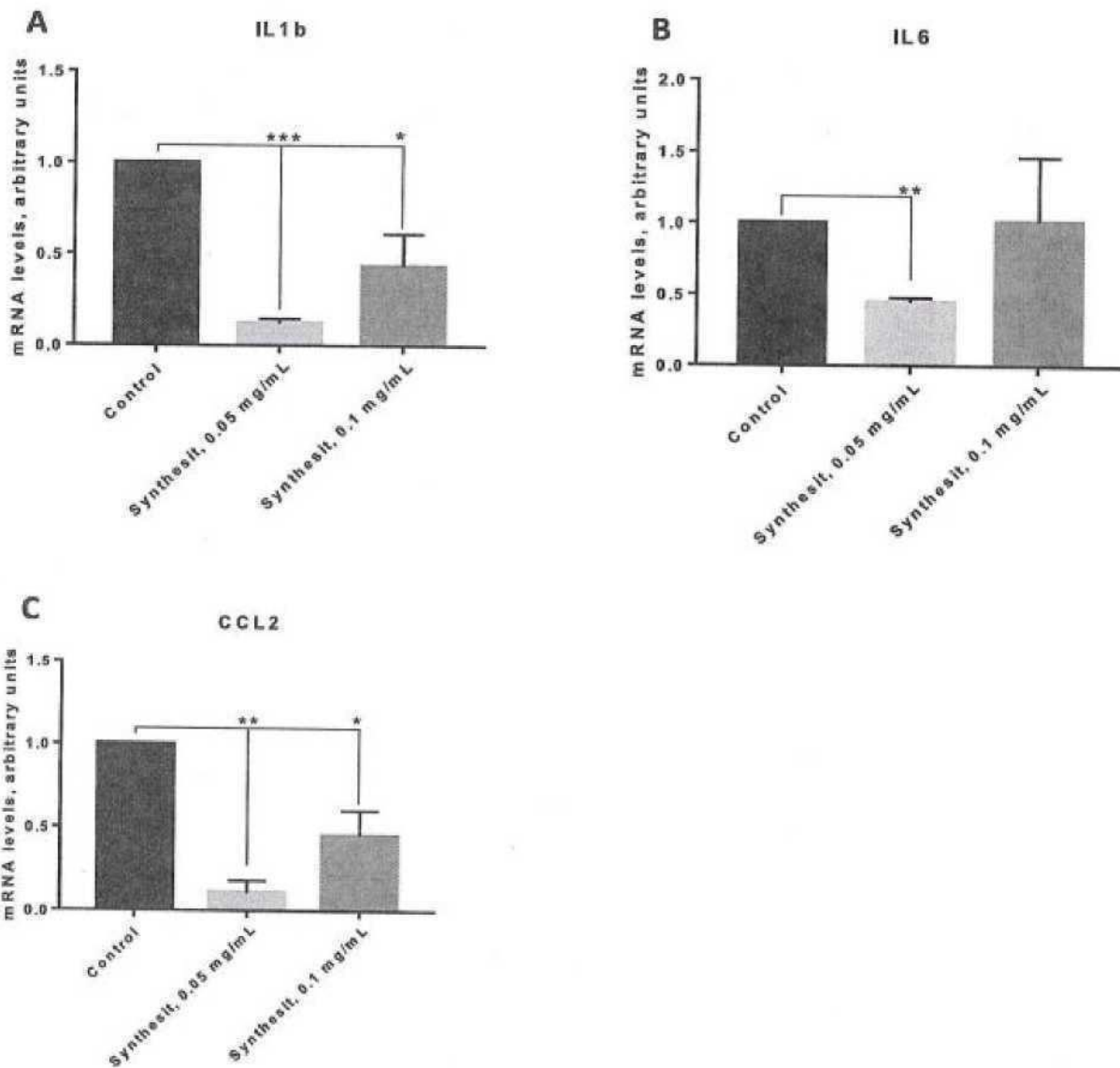


图7. 产物对Thp-1系单核细胞样细胞促炎活性的影响。细胞因子白细胞介素1 β (IL1b, A)，白细胞介素6 (IL6, B) 和趋化因子CCL2 (C) 是感染，癌症和自身免疫性疾病中炎症反应的重要介质。

实验工作的协议

1. SYNTHESIT人胚成纤维细胞培养的细胞毒性研究

培养细胞系

我们使用了人类产后成纤维细胞系进行实验（PHF）。在DMEM（Biolog）中培养PFC细胞，并添加以下成分至最终浓度：10%的胎儿小牛肉血清（FBS，HyClone）和10mcg/ml庆大霉素（Biolog）（下文：培养基）。温育在37° C、5%CO₂的加湿气氛中进行。在实验中使用的是对数生长期的细胞。

研究准备

1 我们获得了化合物用于研究。我们将化合物溶解在1x磷酸盐缓冲液（PBS）中至储备溶液的终浓度为5毫克/毫升。

用于细胞毒性研究的MTT测定

我们使用MTT分析法研究了这些化合物的细胞毒性作用（通过在活细胞中线粒体还原深蓝色晶体甲月替中的3-4,5-二甲基噻唑-2-基-2,5-二苯基吡啶的黄色盐）。我们根据细胞毒性研究的结果绘制了生存曲线并确定了IC₅₀值。

我们将细胞接种到96孔板（Eppendorf，美国）中，将每孔200 μ l培养基中5000细胞的数量接种到96孔板中，并在37° C，5%CO₂的潮湿环境中孵育24小时。然后，将培养基替换为含有初始溶液的连续产物溶液的新鲜培养基，从0.5至0.02毫克/毫升。每个浓度在两个独立的生物实验中以三个重复再现。没有产物的细胞在实验中用作对照（完整）。

将细胞在37° C、5%CO₂、加湿气氛中孵育72小时。化合物具有强烈的黄色。在这方面，在应用MTT溶液之前用新鲜培养基洗出孔。温育结束前1小时，加入20 μ l的MTT水溶液（5毫克/毫升，PanEco Ltd.，俄罗斯）被引入井中。孵育结束后，排除培养液，将细胞重悬于200 μ l DMSO中，并通过Tecan Infinite F50微孔板分光光度计在570纳米级波长下测量光学溶液密度。化合物剂量的每个作用下存活的细胞百分比计算为用该剂量孵育后孔中的平均光密度与对照孔的平均光密度的商（后者的值被接受为100%）。结果示于图1和2。

2. SYNTHESIT 对于HST116和A549肿瘤细胞的细胞毒性研究

培养细胞系

HCT116（人结肠直肠癌）和A549（人肺癌）系用于实验。细胞在DMEM培养基中培养通过添加5%FBS和100微克/毫升庆大霉素（PanEco Ltd.，Russia）（下文：培养液）至最终浓度。温育在37° C、5%CO₂的加湿气氛中进行。在实验中使用的是对数生长期的细胞。

研究资料

提供的Synthesit产物以粉末的形式使用，其在1x磷酸盐缓冲液（PBS）中以5毫克/毫升的储备溶液稀释。

用于细胞毒性研究的MTT测定

我们使用MTT分析法研究了这些化合物的细胞毒性作用（通过在活细胞中线粒体还原深蓝色晶体甲月替中的3-4,5-二甲基噻唑-2-基-2,5-二苯基吡啶的黄色盐）。根据细胞毒性研究的结果绘制具有标准偏差的存活曲线。

我们将细胞接种到96孔板（Eppendorf，美国）中，将每孔180 μ l培养基中5000细胞的数量接种到96孔板中，并在37° C，5%CO₂的潮湿环境中孵育24小时。

在培养液中加入20 μ l所研究物质溶液，用了该溶液制备初始溶液，最终浓度取0.5至0.025毫克/毫升。

没有产物的细胞在实验中用作对照（完整）。

在孵育后的相应时间（72小时），选择了20 μ l的培养基并加入了20 μ l的10倍MTT溶液，然后在细胞培养箱中保持了1.5小时。孵育结束后，排除培养液，将细胞重悬于200 μ l DMSO中，并通过Infinite F50微孔板分光光度计(Tecan, USA)在570nm波长下测量光学溶液密度。溶液的光密度与活细胞的数量成正比。化合物剂量的每个作用下存活的细胞百分比计算为用该剂量孵育后孔中的平均光密度与对照孔的平均光密度的商（100%存活率）。结果示于图13-6. 在每个曲线图的Y轴上以%表示存活率。

3. SYNTHESIT对THP1单核细胞样细胞培养物的免疫原活性

培养细胞系

THP1(人单核细胞样细胞)系用于实验。细胞在RPMI培养基中培养通过添加5%FBS和100微克/毫升庆大霉素（PanEco Ltd., Russia)(下文：培养液)至最终浓度。温育在37° C、5%CO₂的加湿气氛中进行。在实验中使用的是对数生长期的细胞。

研究资料

提供的Synthesit产物以粉末的形式使用，其在1x磷酸盐缓冲液（PBS）中以5毫克/毫升的储备溶液稀释。

促炎细胞因子的基因表达分析

将细胞接种到6孔板（Eppendorf, USA）中，每孔100万细胞浓度。使用插层荧光样品（SYBR-Green, Evrogen）进行聚合酶链式反应（PCR）。使用NCBI Primer-BLAST应用选择CCL2, IL-1 β , IL-6, HSP90 (Evrogen)的引物。HSP90用作参考基因。为了确定基因表达水平，使用CFX Connect™ 实时PCR检测系统（BioRad Laboratories）进行测量。结果示于图7。

该报告编写:

Dukhinova M. S.

[签名]

生物科学候选人

01.10.2020

实验肿瘤学和免疫学实验室

Dukhinova@scamt-itmo.ru;89670682951

[印章: 化学和生物屏障. 联邦州自治教育机构. 国家研究所]