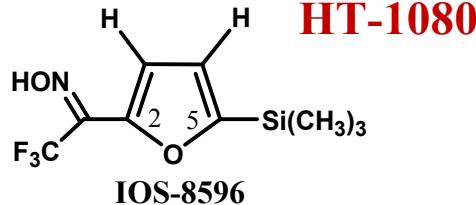


Projekts Nr. 6

„Pretvēža terapijas un vēža metastazēšanos inhibējošu medikamentu izpēte”

Darba mērķis: specifiskā citotoksisķā efekta, kas tiek ģenerēts elementorganiskās vielas, triptofāna molekulas un skābekļa mijiedarbības rezultāta izpēte ar nolūku radīt jauna tipa savienojumus ar pretvēža aktivitāti.

Latvijas Organiskās sintēzes institūts
Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrs

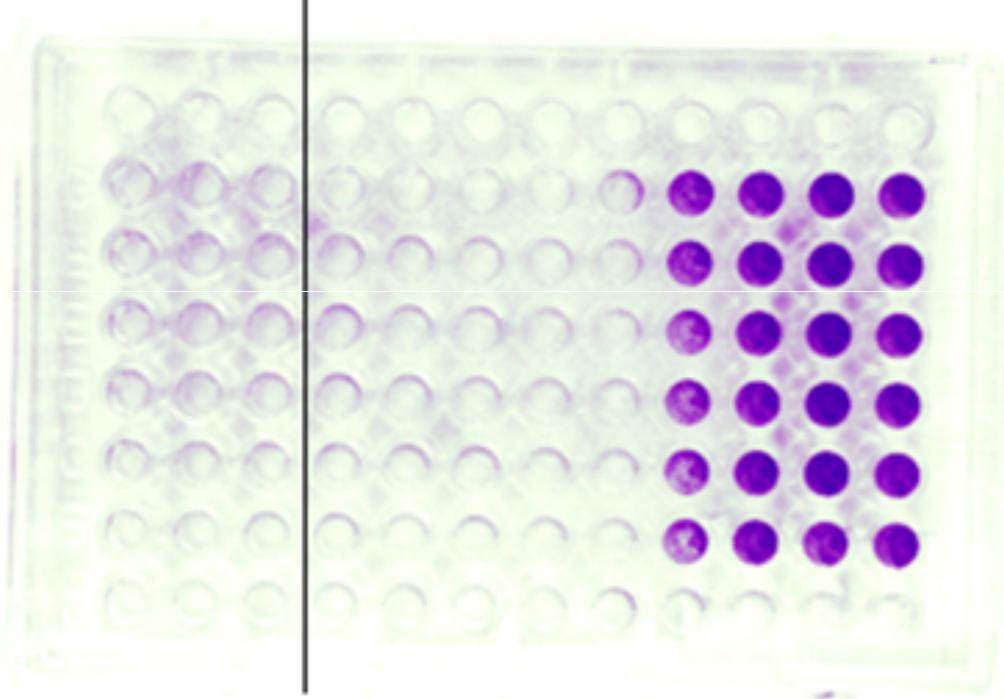


5-Trimethylsilyl-2-trifluoroacetyl furan oxime

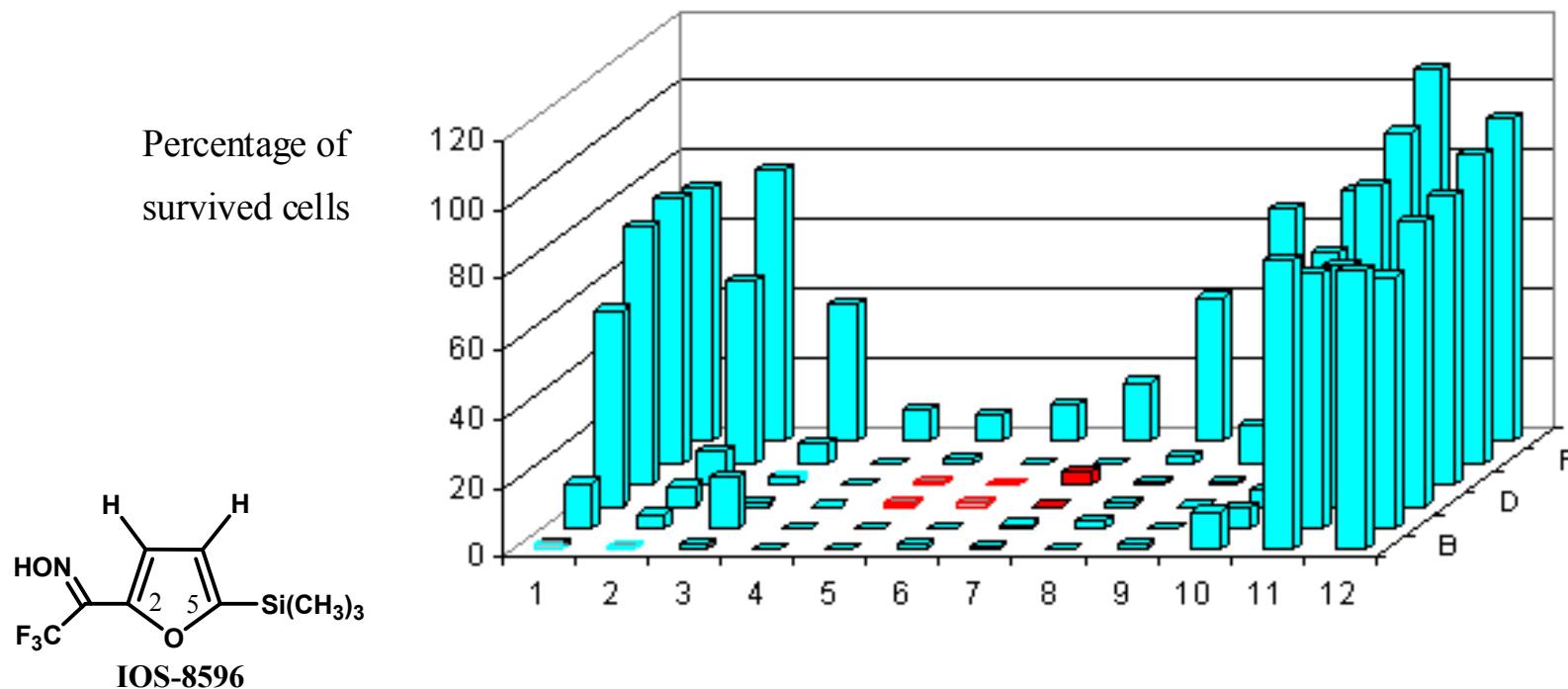
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	row
A	104	105	100	104	105	100	104	105	100	104	105	100	
B	105	105	95	105	105	95	105	105	95	105	105	95	
C	107	109	96	107	109	96	107	109	96	107	109	96	
D	108	108	101	108	108	101	108	108	101	108	108	101	
E	100	98	98	100	98	98	100	98	98	100	98	98	
F	101	97	97	101	97	97	101	97	97	101	97	97	
G	105	105	95	105	105	95	105	105	95	105	105	95	
H	107	109	96	107	109	96	107	109	96	107	109	96	
	[10]	[10]	[10]	[1]	[1]	[1]							µg/ml

Three rows of
wells containing
IOS-8596

Control wells

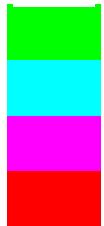
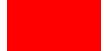


Šūnu nomākšana pēc IOS-8596 pievienošanas sešos lauciņos plates centrā



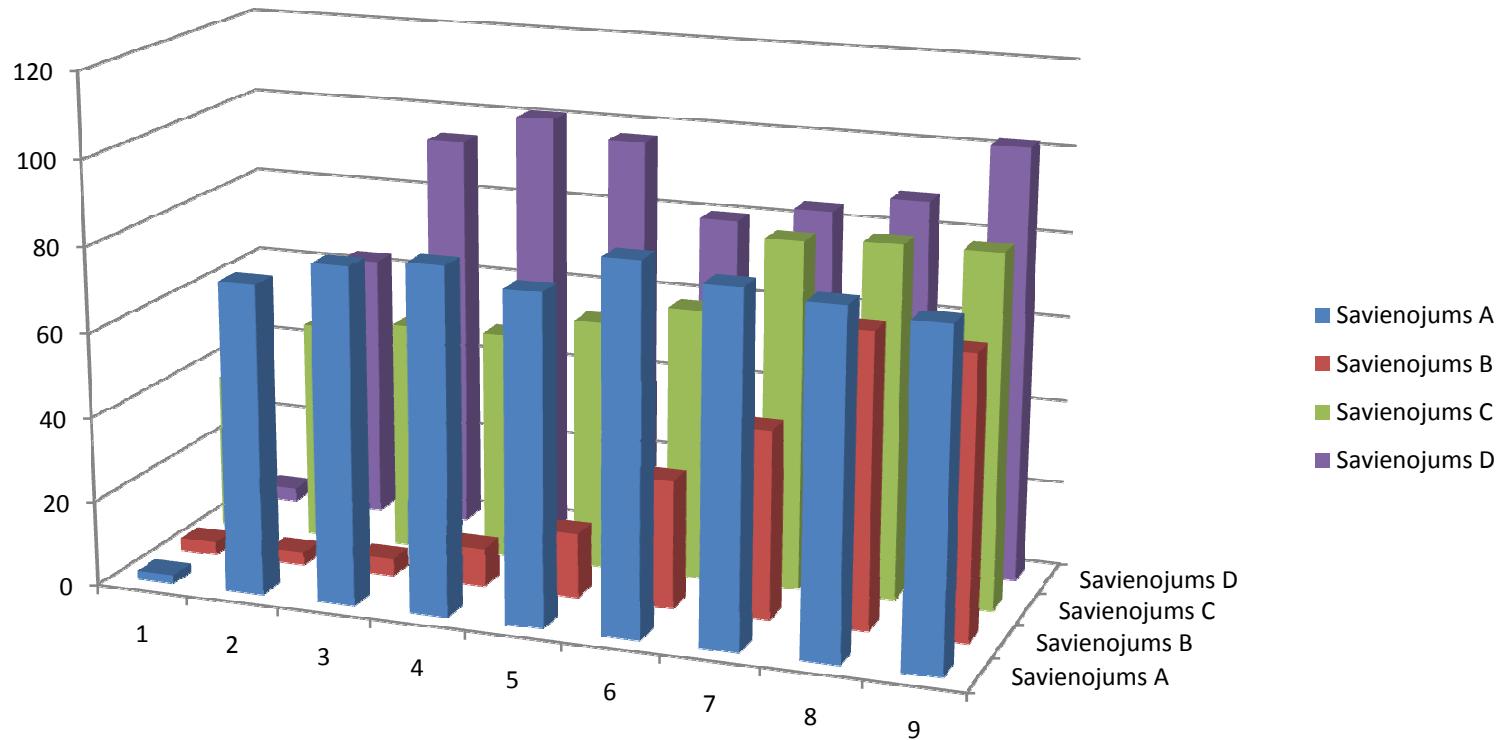
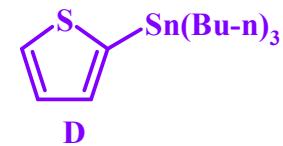
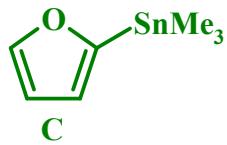
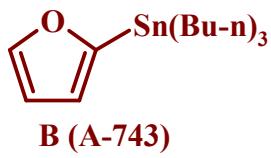
Lauciņu-emiteru un lauciņu-detektoru izvietojums uz 96-lauciņu plates

	lauciņi-emiteri 1-3 rindas	lauciņi-detektori 4-12 rindas											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	row
A	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
B	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
C	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
D	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
E	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
F	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
G	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
H	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	

 - cultural medium
 - cultural medium and cells
 - cultural medium and IOS-8596
 - cultural medium, cells and IOS-8596

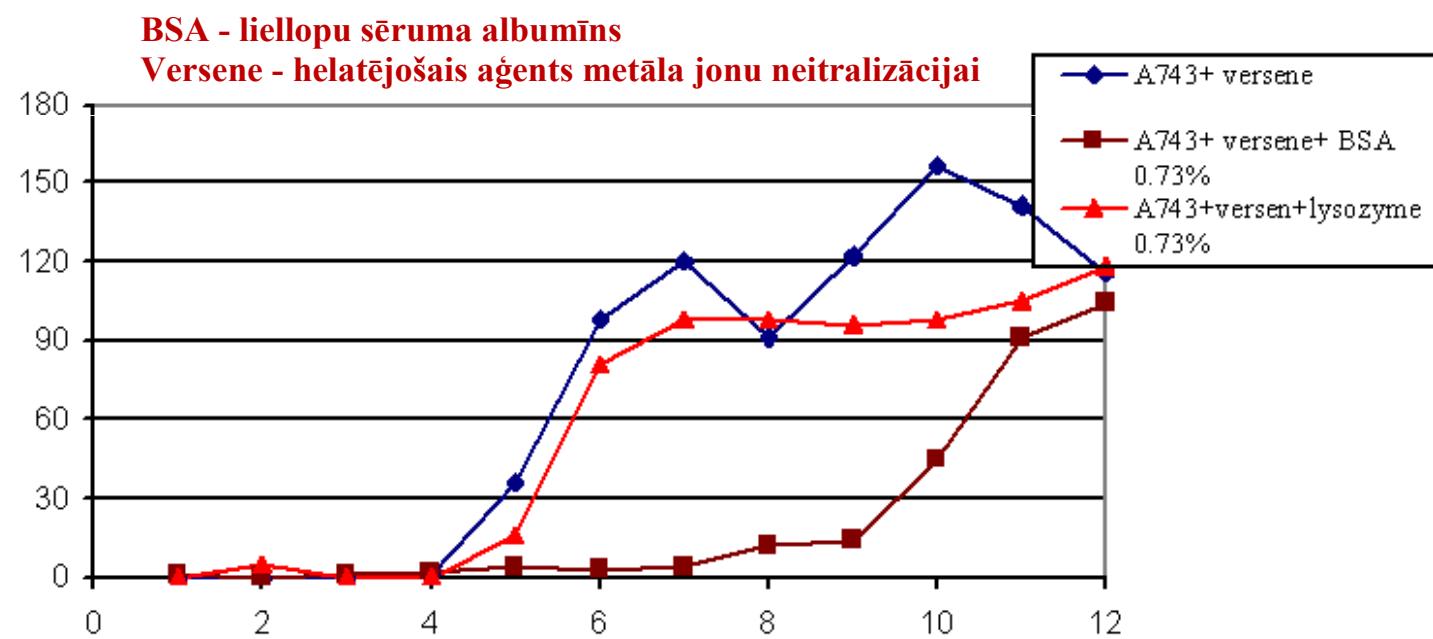


A



Lauciņu-emitoru vides sastāva ietekme uz citotoksisko efektu

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A743+ versene	0	0	0	1	36	98	120	91	122	156	141	116
A743+ versene+ BSA 0.73%	1	0	1	2	4	3	4	12	14	45	91	104
A743+versen+lysozyme 0.73%	0	5	0	0	16	81	98	98	96	98	105	118



Chemoluminescence (CL) following the irradiation of rose bengal/protein (75 µM) at 25 °C.

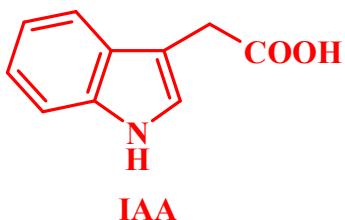
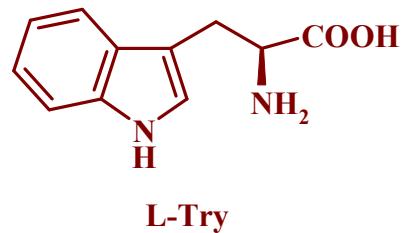
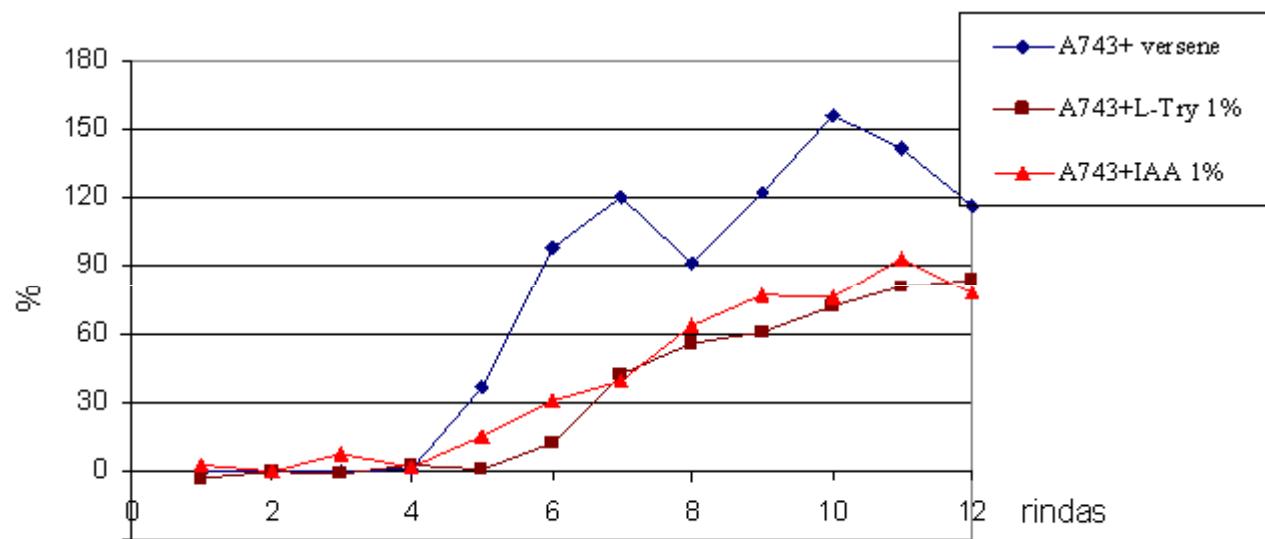
Protein	CL initial 10^6 counts minute	Integrated CL 10^6 counts	Half-time minutes
HSA	115	375	1.9
BSA	46.3	125	1.2
Lysozyme	3.9	12	1.0
Insulin(*)	0.05	0.37	4.6
Control without protein	0.01	0.1	

(*) Proteins without Trp residues.

Photochem. Photobiol., 2007, 83 (3), 475-480

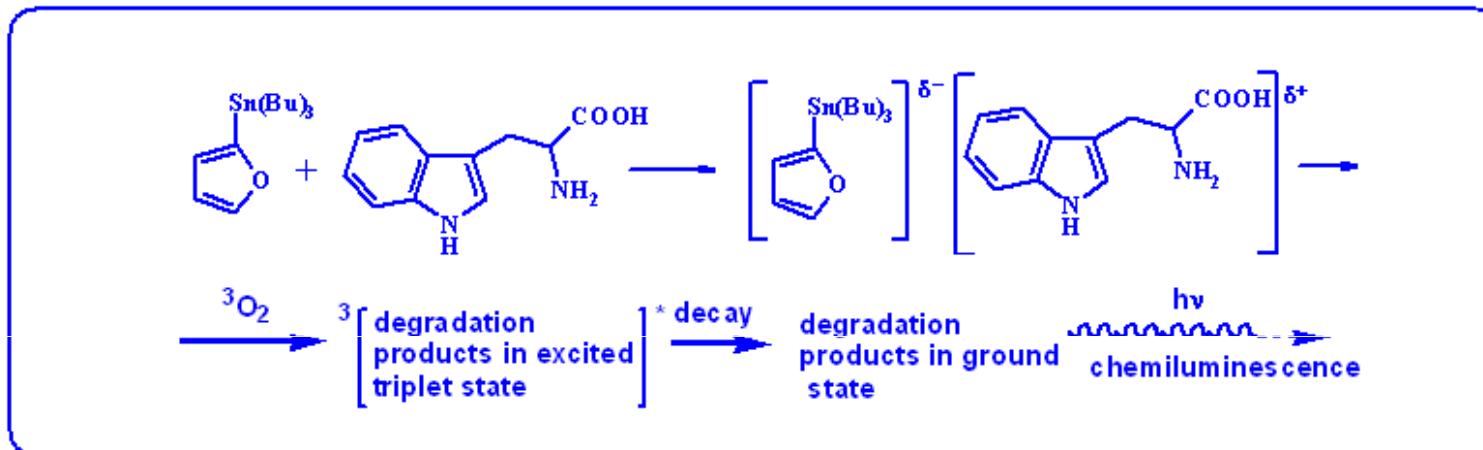
Indolsaturošu savienojumu ietekme uz citotoksisko efektu

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A743+ versene	0	0	0	1	36	98	120	91	122	156	141	116
A743+L-Try 1%	-3	0	-1	3	1	12	42	56	61	72	81	84
A743+IAA 1%	3	0	8	2	15	31	39	63	77	76	93	78

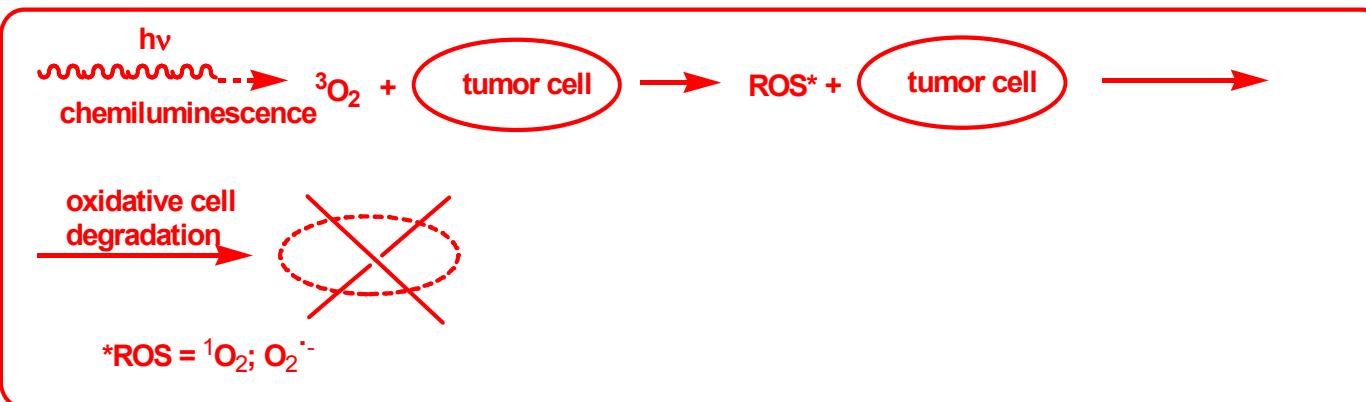


Presumed mechanism of cytotoxic chemiluminescence generated by tributylfurylstannane and triptophane interaction

Well-emitters



Well-detectors



Brīvo radikāļu uztvērēju ietekme uz citotoksiskās hemiluminiscences intensitāti

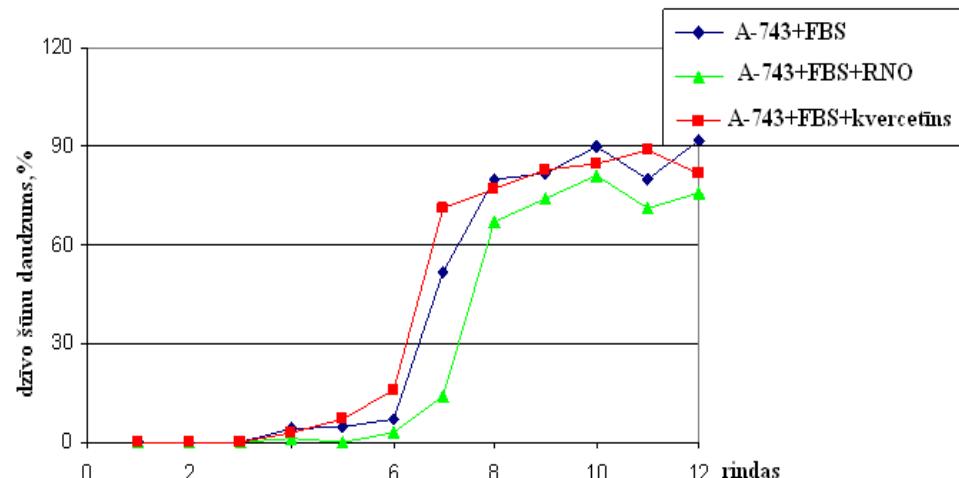
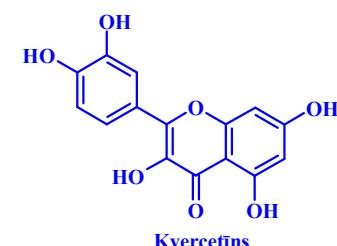
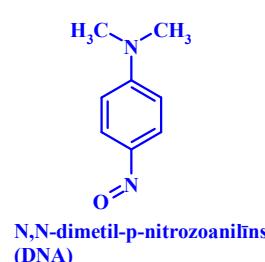
Eks p. Nr.	Vielu sastāvs lauciņos emiteros	Radikāļu uztvērējs lauc.- detektoros	Izdīvojošu šūnu daudzums (%) lauciņu detektoru vertikālās rindās*								
			4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	A-743+ fb + 5% FBS	-	4	5	7	52	80	82	90	80	92
2	A-743+ fb + 5%FBS +	DNA**	1	0	3	14	67	74	81	71	76
3	A-743+ fb + 5% FBS +	Kver- cetīns***	3	7	16	71	77	83	85	89	82

*salīdzinot ar kontroli.

** N,N-dimetil-p-nitrozoanilīns – ierosināta singleta skābekļa (${}^1\text{O}_2$) uztvērējs

*** kvercetīns – NO un skābekļa superoksīda anjonradikāļa uztvērējs

FBS - fetālais teļu serums



Citotoksiskais efekts uz vēža un normālām šūnu līnijām

Šūnu līnijas	Paneles rindas											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
MDA (v)	0	0	0	4±4	4±4	4±4	15±10	40±18	59±11	73±12	83±8	95±5
MG-22A (v)	0	0	0	3±2	9±13	20±30	36±31	51±25	62±21	70±20	81±18	87±12
MESSA(v)	0	0	0	3±1	4±1	6±2	15±9	31±15	49±22	74±13	83±22	97±26
BHK-21(n)	0	0	0	6±3	16±9	30±16	66±7	87±6	97±5	103±4	108±4	108±17
HT-1080 (v)	0	0	0	6±5	4±5	19±15	67±33	92±12	96±10	99±8	96±12	92±11
B16 (v)	0	0	0	15±11	27±14	36±19	48±30	65±34	84±32	92±23	95±18	93±9
3T3 (n)	0	0	0	17±19	33±26	56±45	80±46	101±10	108±9	103±8	102±13	101±17
SH-SY-5Y(v)	0	0	0	3±3	2±7	62±49	88±30	104±17	99±17	110±23	105±14	105±15
Splenociti (n)	0	0	0	0±3	25±30	51±54	65±42	75±28	83±16	86±7	92±7	103±15
A7R5 (n)	0	0	0	37±8	57±6	82±12	91±9	97±15	100±8	97±16	101±7	101±11
H9C2 (n)	0	0	0	8±10	71±12	86±5	95±11	97±20	94±14	95±21	93±8	93±15

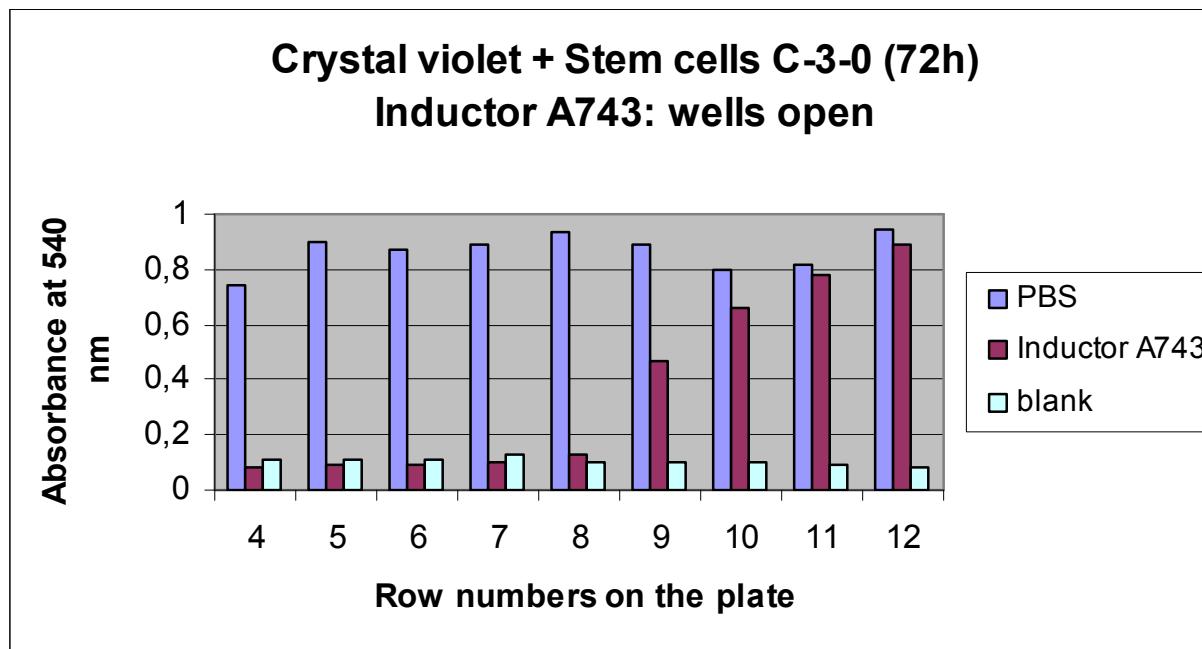
Citotoksiskais efekts Intensīvs Vidējais Vājs Ľoti vājš

v-vēža šūnu līnija

n-normāla šūnu līnija

Citotoxic effect against Stem cells C-3-0

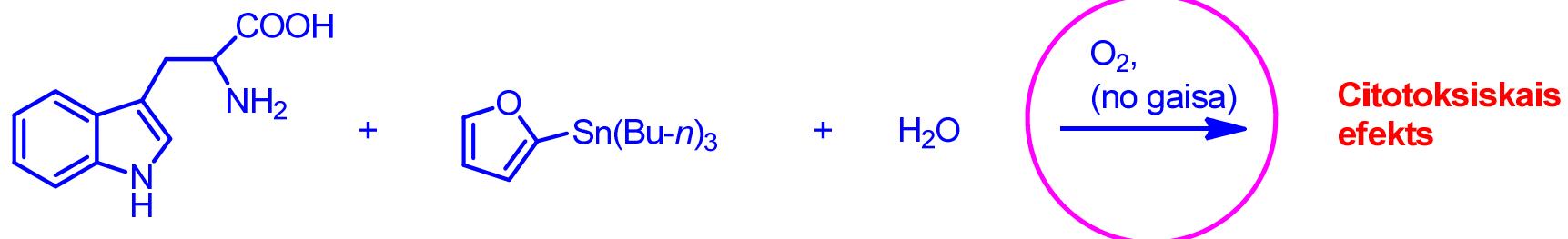
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0,085	0,088	0,087	0,103	0,095	0,097	0,088	0,088	0,084	0,085	0,084	0,085
0,073	0,070	0,072	0,088	0,097	0,091	0,100	0,112	0,253	0,633	0,832	0,861
0,074	0,076	0,081	0,086	0,094	0,094	0,106	0,124	0,406	0,650	0,710	0,931
0,074	0,077	0,072	0,083	0,098	0,088	0,102	0,143	0,545	0,611	0,768	0,880
0,086	0,090	0,080	0,078	0,099	0,095	0,107	0,168	0,452	0,681	0,746	0,914
0,094	0,087	0,086	0,087	0,099	0,111	0,111	0,137	0,567	0,660	0,761	0,885
0,066	0,077	0,072	0,070	0,082	0,085	0,080	0,079	0,595	0,722	0,847	0,889
0,074	0,077	0,071	0,080	0,083	0,076	0,087	0,084	0,101	0,089	0,082	0,083



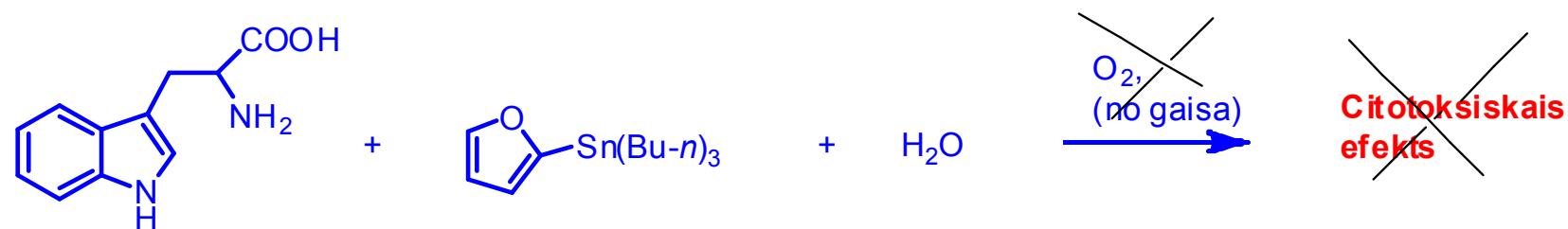
Secinājumi

- 1. 2010.-2011. gados tika radīta metodoloģiskā bāze citotoksiskā efekta *in vitro* pētīšanai, kas tiek ģenerēts trialkilstannāna, triptofāna un skābekļa mijiedarbības rezultātā, kas izplatās telpā un nomāc vēža šūnu augšanu.**
- 2. Citotoksiskais efekts tiek novērots tikai eikariotisko šūnu gadījumā, iedarbojoties uz to vairošanās procesu. Tāpēc intensīvi proliferējošu vēža šūnu dalīšanās tiek nomākta daudz spēcīgāk nekā normālu šūnu dalīšanās.**

Pētījumu mērķis 2012. gadam: citotoksikā efekta ķīmiskā mehānisma izpēte ar nolūku radīt bāzi jauna tipa pretvēža savienojumu sinēzei.

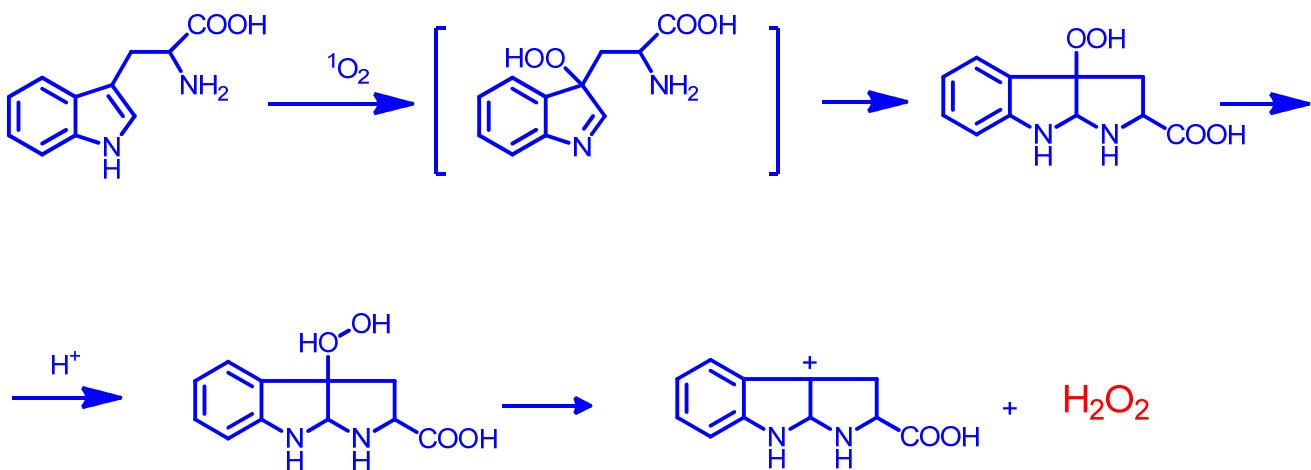


- Gaisa skābekļa eliminēšana, aizlīmējot plates lauciņus ar plēvi.



- Gaisa skābekļa aizvietošana ar H_2O_2
- Gaisa skābekļa aizvietošana ar neorganiskiem un organiskiem oksidētājiem

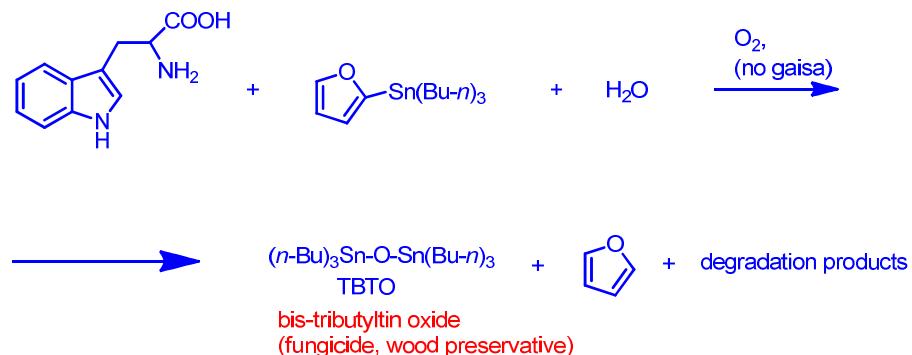
Oksidētāji	Izdzīvojušo šūnu daudzums paneles rindās salīdzinājumā ar kontroli											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
KMnO ₄	0	0	0	84	85	94	100	98	100	103	98	92
KJO ₄	0	0	0	108	95	92	87	90	87	86	95	85
MCPBA	0	0	0	120	116	115	107	114	102	105	113	101
H ₂ O ₂	0	0	0	0	0	5	8	7	15	18	25	31



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Red	Red	Red	Light Blue								
B	Red	Red	Red	Light Blue								
C	Red	Red	Red	Light Blue								
D	Red	Red	Red	Light Blue								
E	Red	Red	Red	Light Blue								
F	Red	Red	Red	Light Blue								
G	Red	Red	Red	Light Blue								
H	Red	Red	Red	Light Blue								

A-743+BSA+Try
The Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit

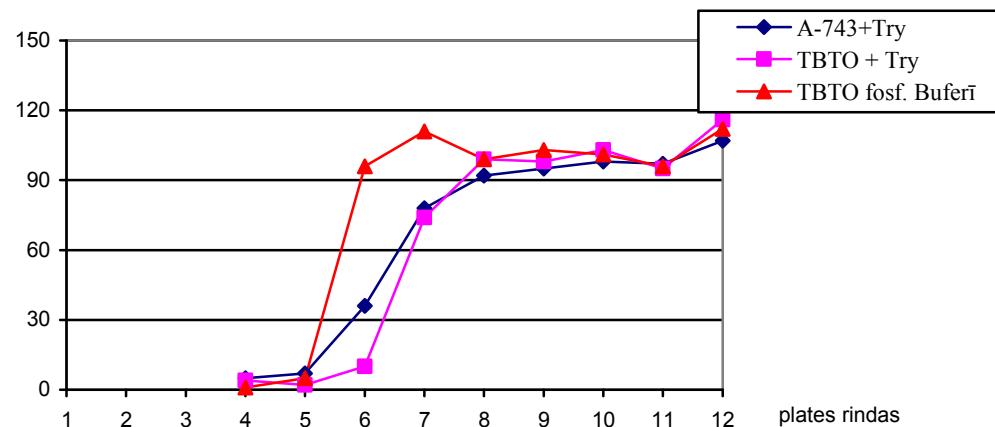
s

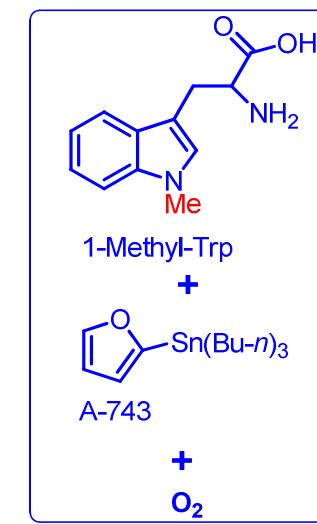
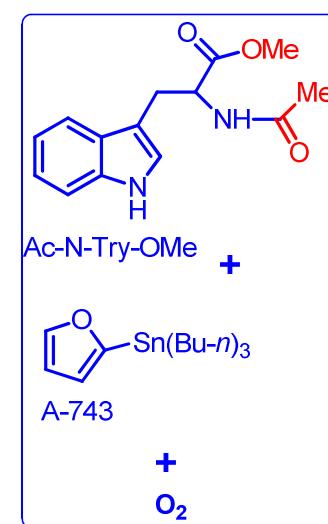
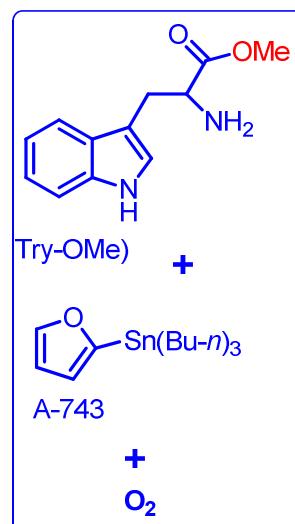
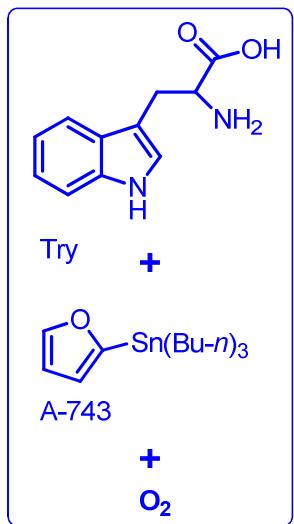


TBTO IC₅₀ attiecībā pret HT-1080 šūnam ir 0.2 mkg/ml

Dzīvo šūnu daudzums % salīdzinājumā ar kontroli

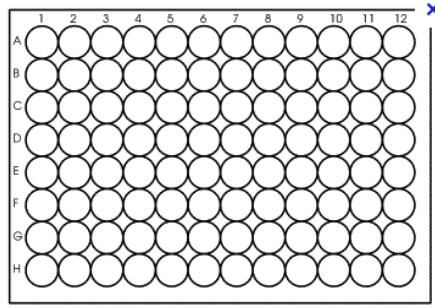
Inkubēšanas apstākļi	Paneles rindas											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A-743 + Try	0	0	0	5	7	36	78	92	95	98	97	107
Try + 0.4 mg/ml TBTO	0	0	0	4	2	10	74	99	98	103	95	116
Try + 0.04 mg/ml TBTO	0	0	0	4	2	40	109	105	104	102	102	112
0.4 mg/ml TBTO fosfātā buferī	0	0	0	4	2	40	109	105	104	102	102	112



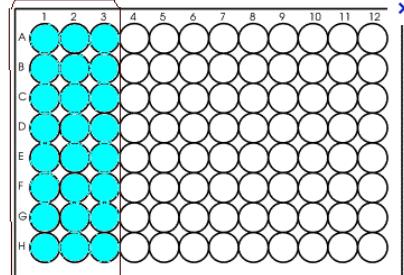


Lauciņi emiteri	Izdzīvojušo šūnu daudzums paneles rindās salīdzinājumā ar kontroli											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A743 + Try + O ₂	0	0	0	0	0	37	63	78	76	75	79	102
A743 + Trp-OMe+ O ₂	0	0	0	82	81	95	100	113	99	95	101	122
A743 + Ac-N-Trp-OMe + O ₂	0	0	0	1	0	1	0	2	23	41	51	88
A743 + 1-Methyl-L-Trp + O ₂	0	0	0	113	122	104	133	105	95	99	99	88

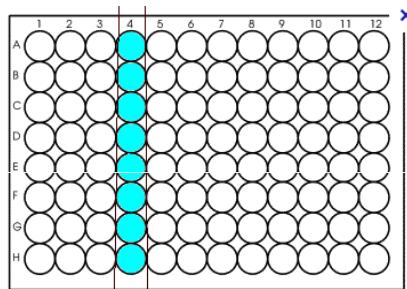
Paneles vāka izgriezumu efekts



96-lauciņu panele



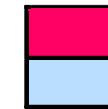
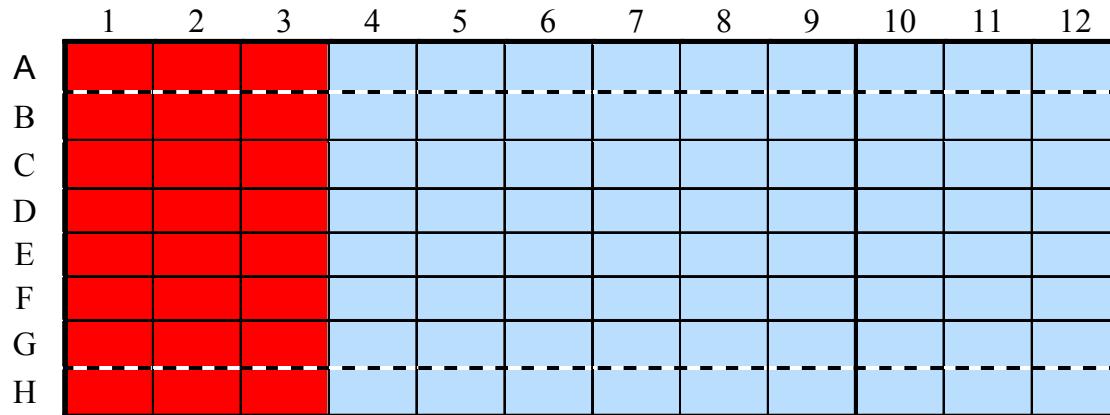
**96-lauciņu paneles vāks
ar izgrieztiem caurumiem virs
1.-3. rindu lauciņiem**



**96-lauciņu paneles vāks ar izgrieztiem caurumiem virs
4. rindas lauciņiem**

Try + TBTO	Izdīvojušo šūnu daudzums paneles rindās salīdzinājumā ar kontroli											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Izgriezuma nav	0	0	0	2	0	7	97	89	119	110	103	101
Izgriezums virs rindām 1-3	0	0	0	14	126	96	88	94	98	118	100	111
Izgriezums virs rindām 1, 2	0	0	0	112	121	99	92	99	104	113	113	95
Izgriezums virs rindas 1	0	0	0	73	141	156	186	143	169	167	135	67
Izgriezums virs rindas 4	0	0	0	6	74	76	81	97	103	109	112	90

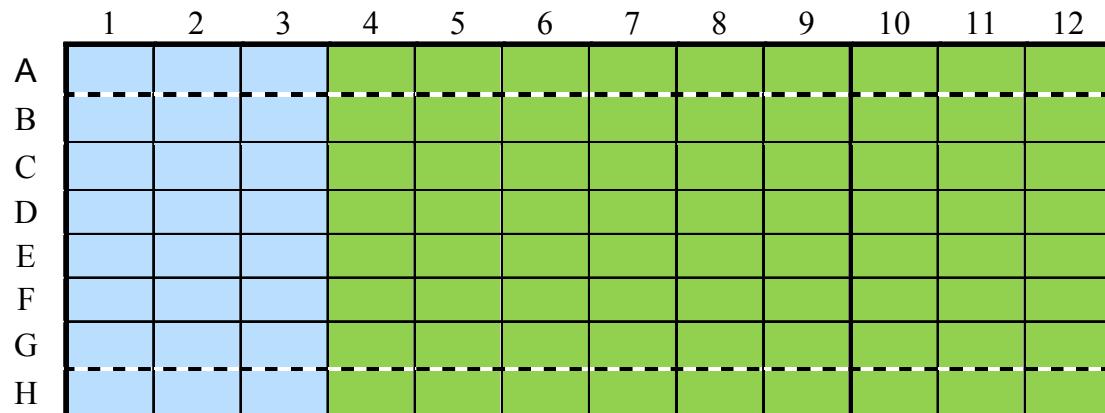
Plate 1.



A-743+BSA+Try
Üdens

s

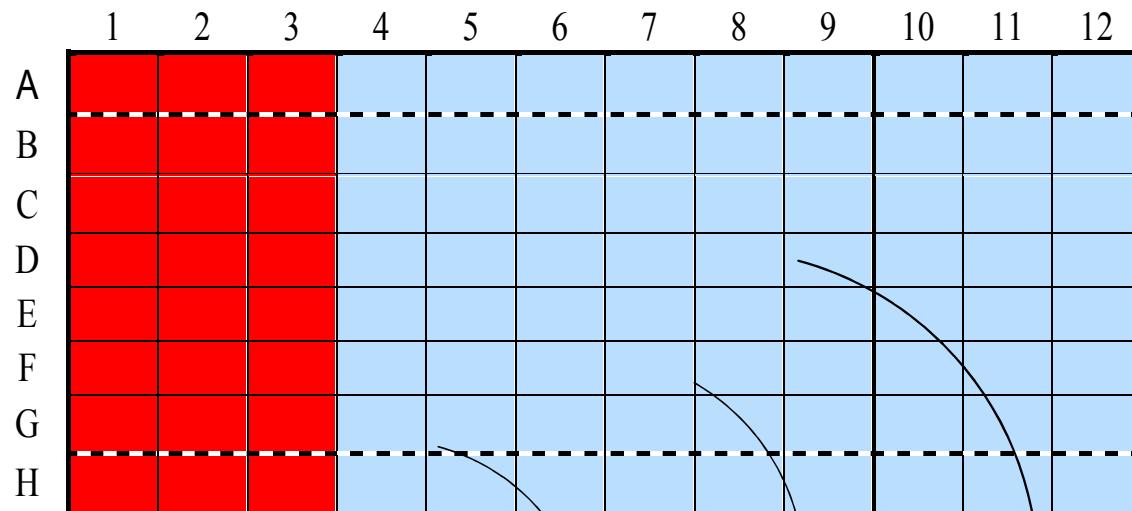
Plate 2.



HT-1080
Üdens

s

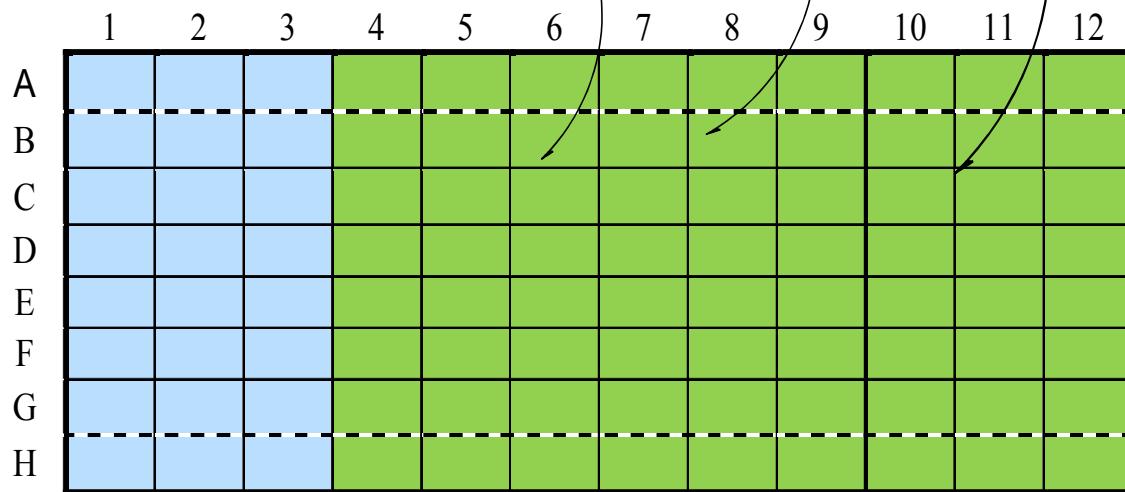
Plate 1.



d
A-743+BSA+Try
Ūdens

72 stundas 37°C, 5% CO₂

Plate 2.

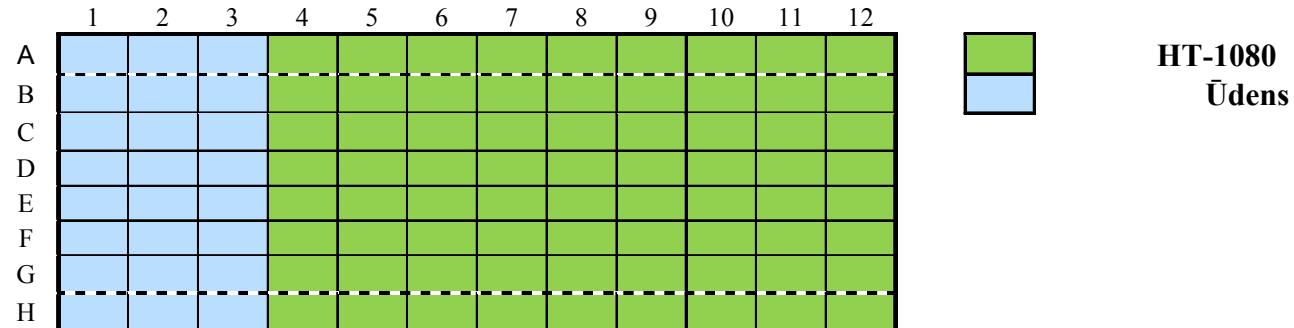


0,05 ml 20x10⁴ šūnas/ml d
HT-1080
Ūdens

72 stundas 37°C, 5% CO₂

s

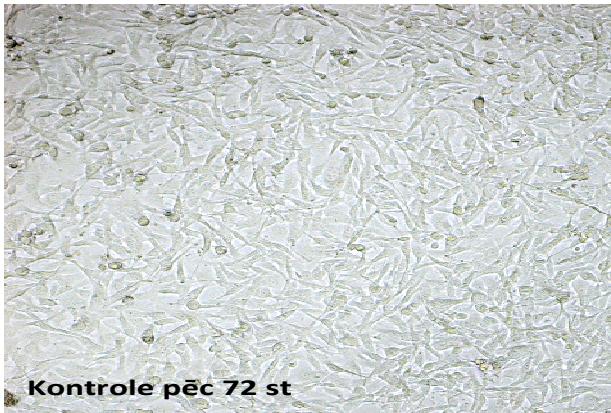
Plate 2. Eksperiments B



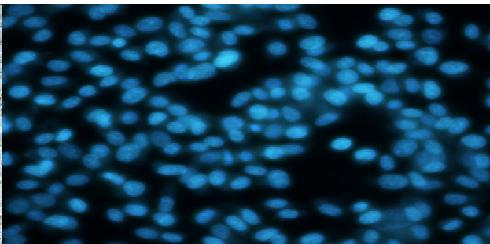
Kulturālās vides maiņa ar svaigu vidi un papildus inkubēšana 72 stundas

Dzīvo šūnu daudzums % salīdzinājumā ar kontroli

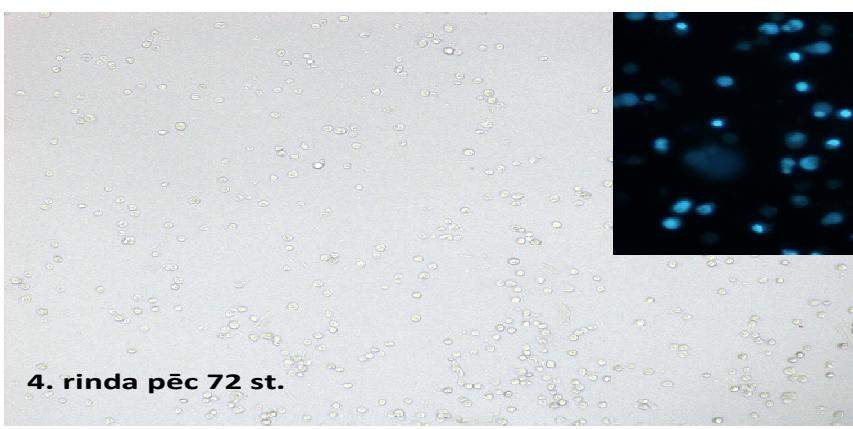
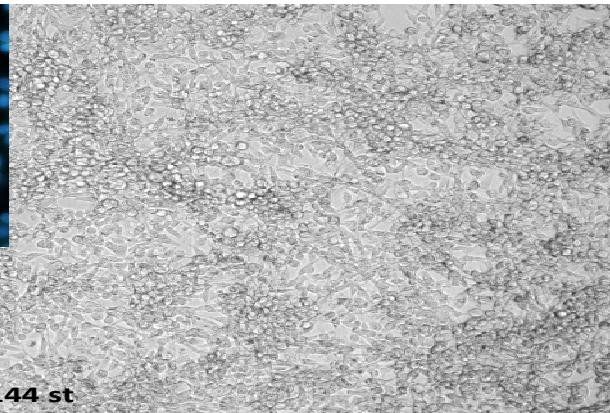
Inkubēšanas apstākļi	Paneles rindas											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Inkubēšana 72 st.	-	-	-	0	0	1	46	81	85	92	90	85
Vides maiņa un papildus inkubēšana 72 st.	-	-	-	2	1	1	23	55	76	77	92	108



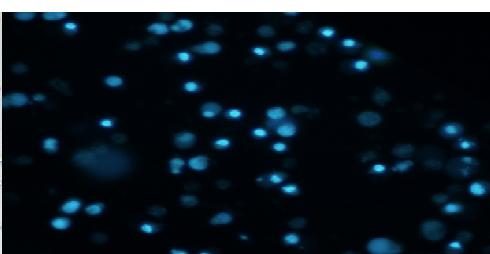
Kontrole pēc 72 st.



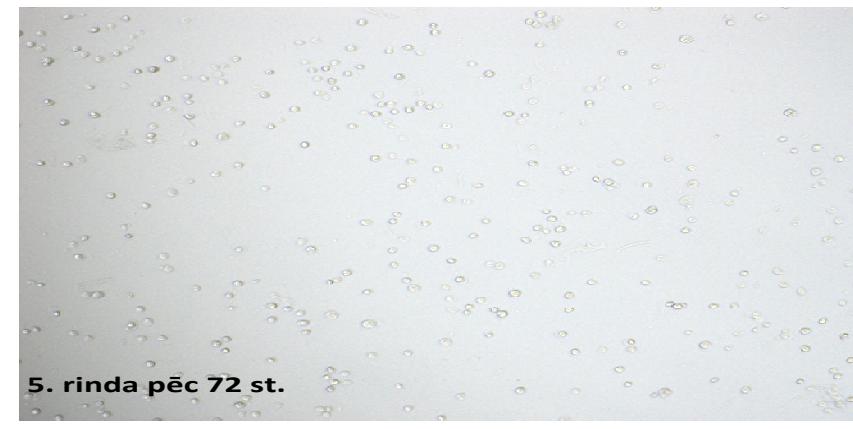
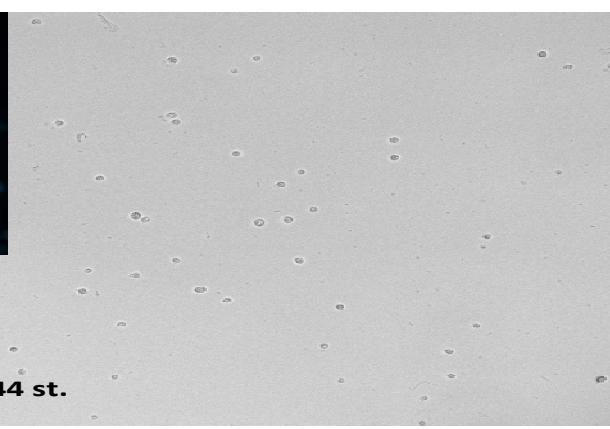
Kontrole pēc 144 st.



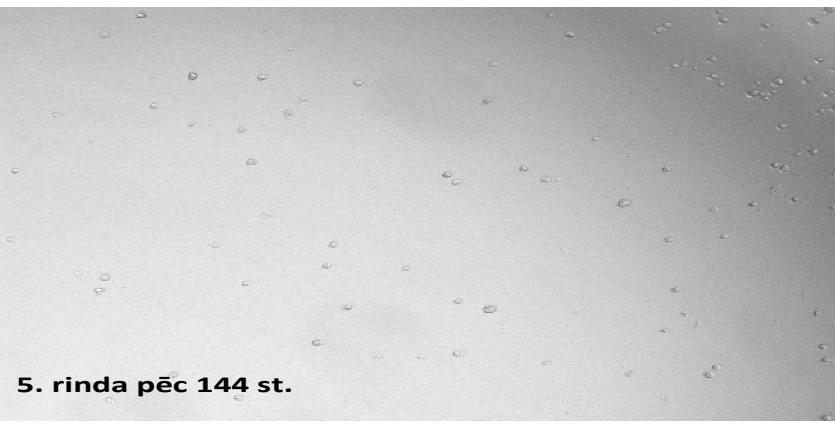
4. rinda pēc 72 st.



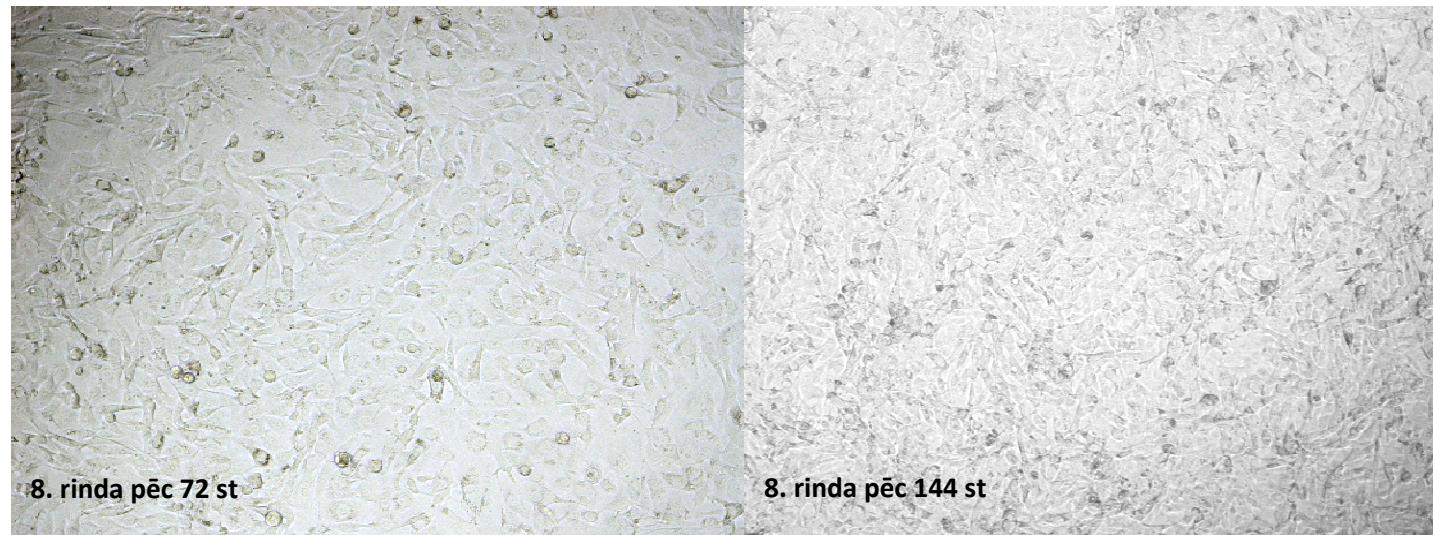
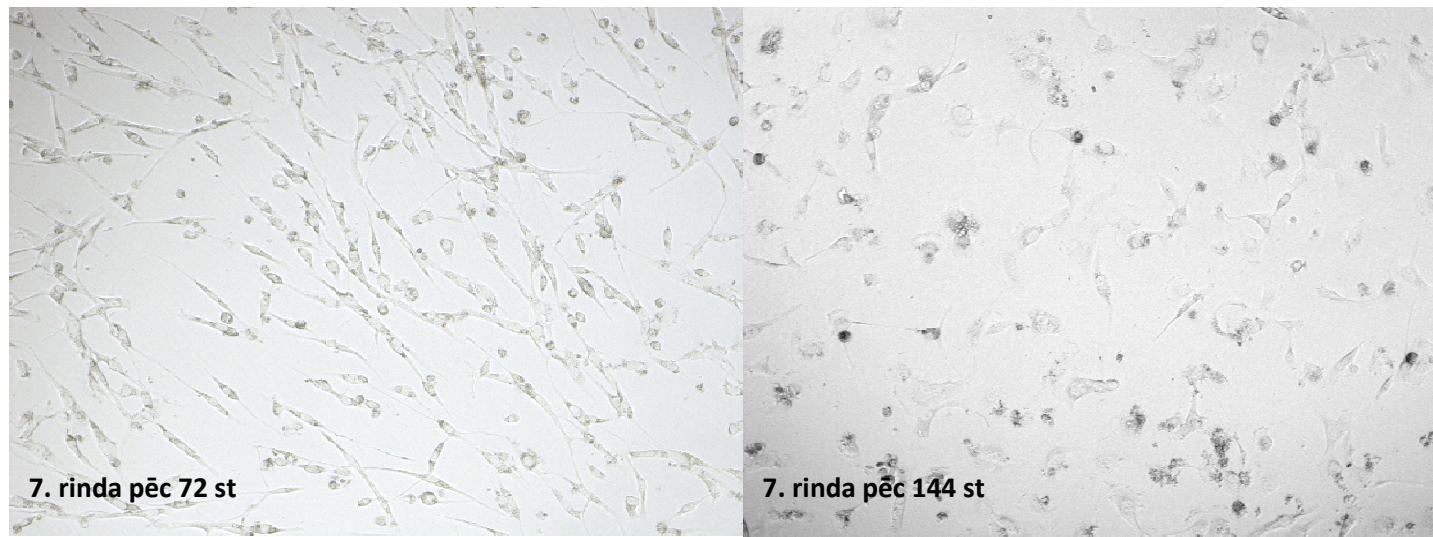
4. rinda pēc 144 st.



5. rinda pēc 72 st.

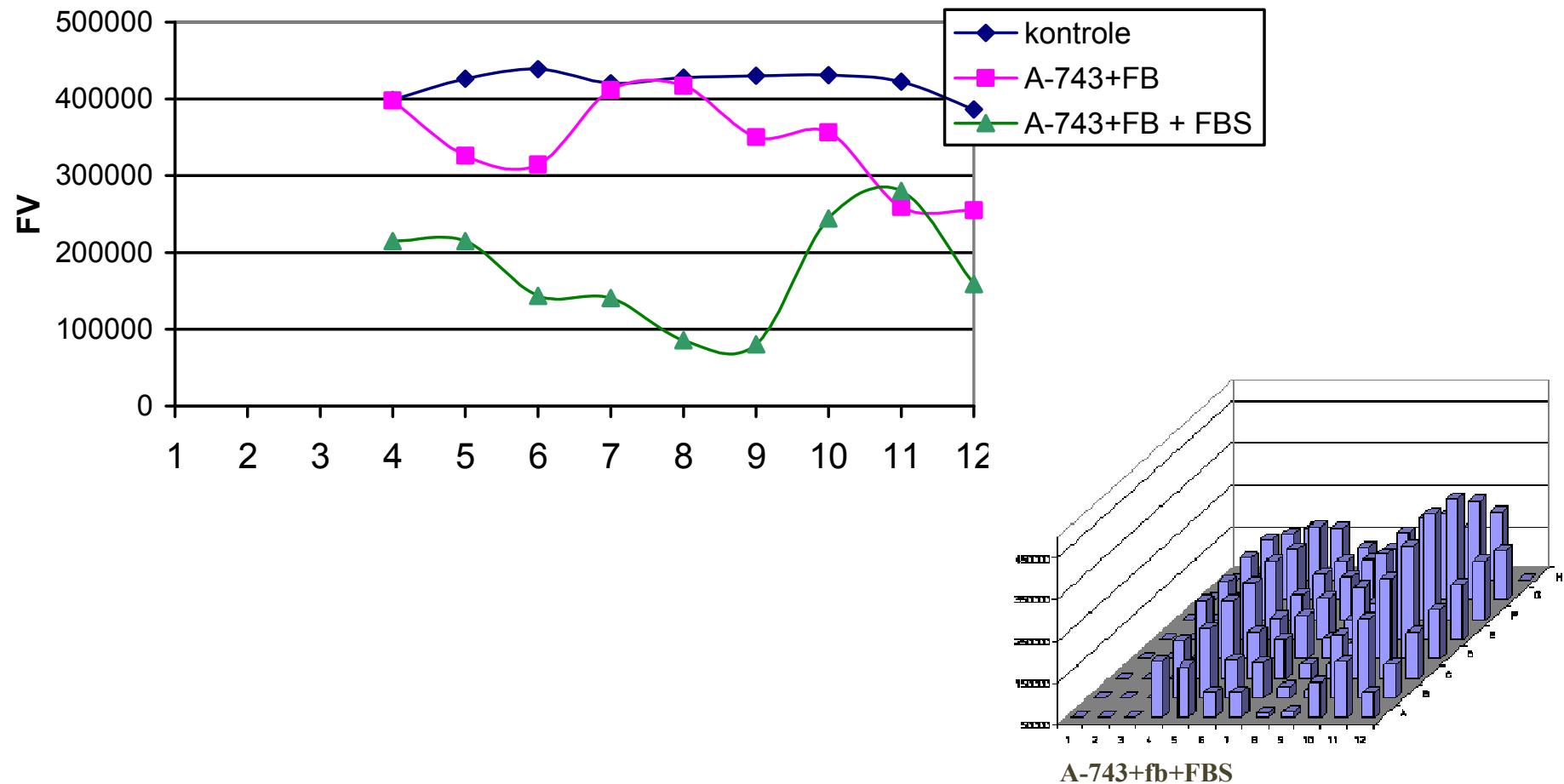


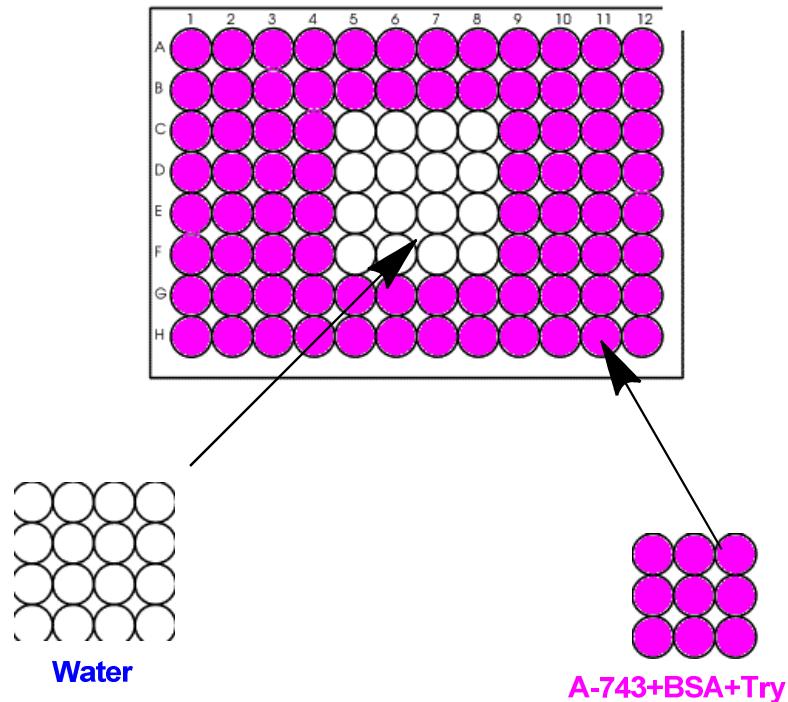
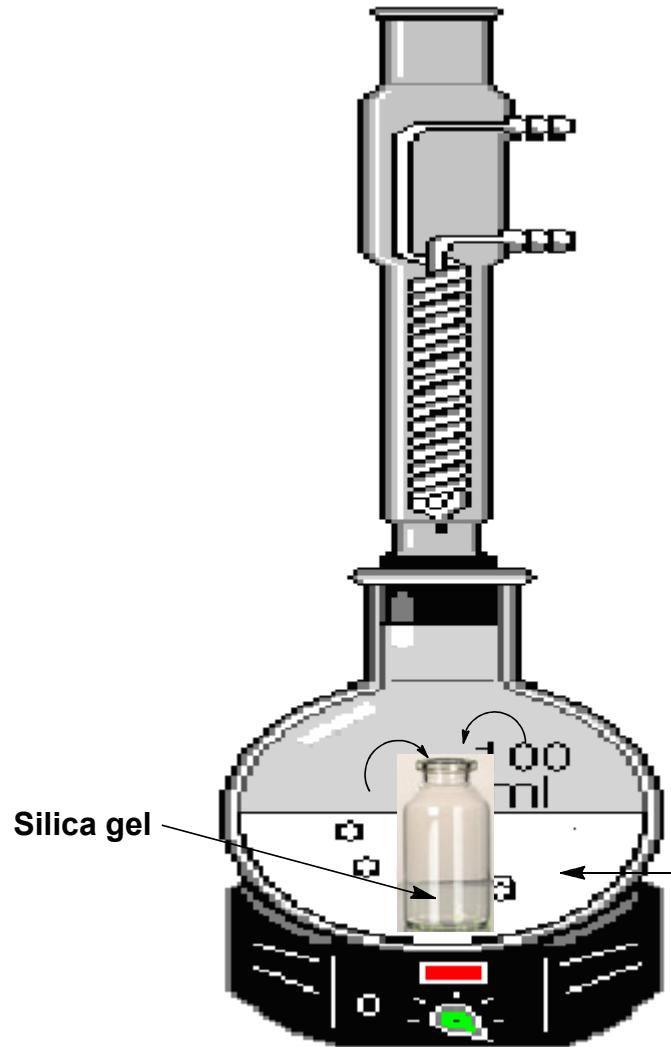
5. rinda pēc 144 st.

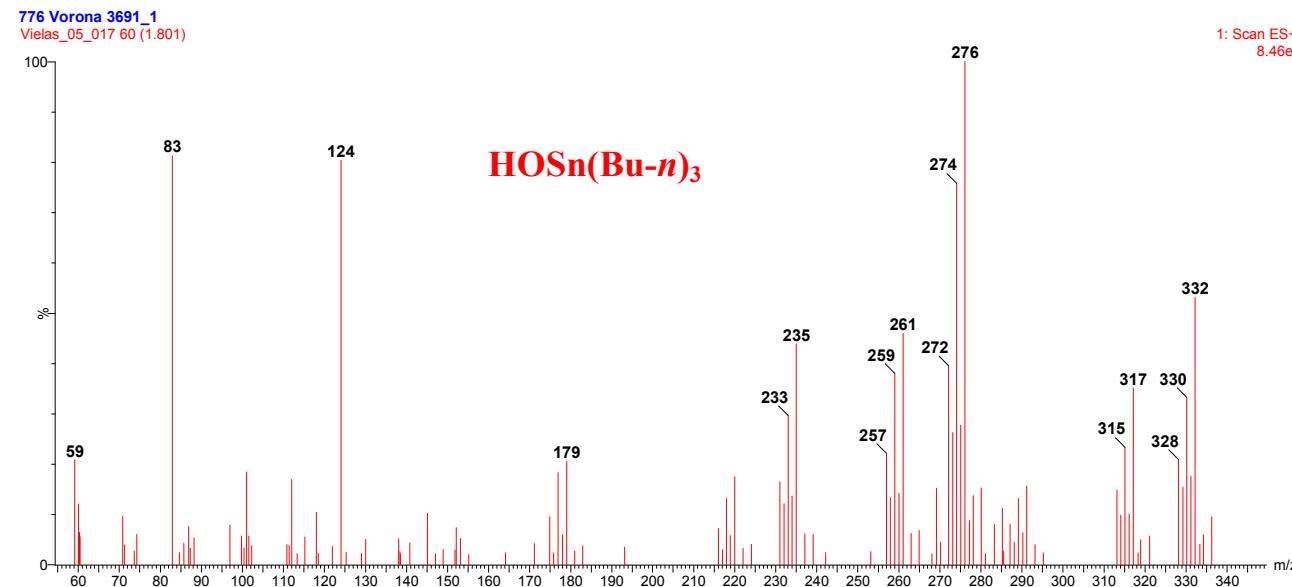
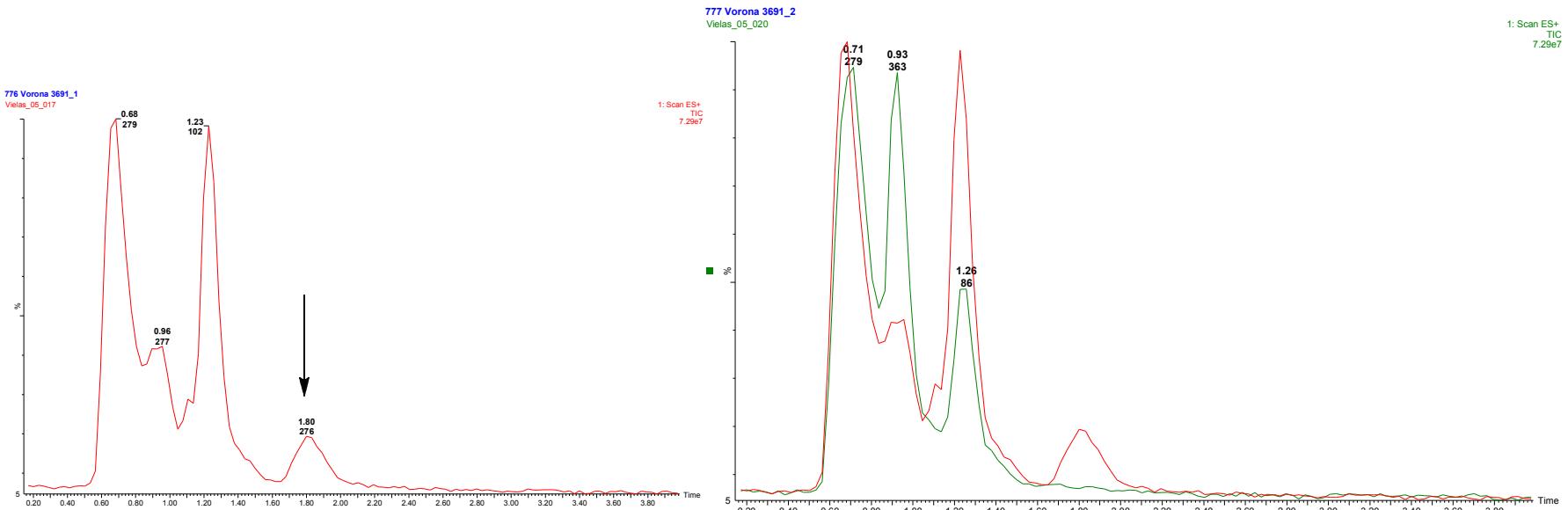


Proteīns	Masa, Da (kontrole)	Masa, Da (fosfāta buferī)	Vidējā masa, Da	Pēc apstrādes ar A-743+Try+O₂, Da	Masu starpība, Da
Ubikuitīns	9491	9474	9482	9629	+147 (+1.5%)
SrtA (sortāze A)	17939	17935	17937	18123	+186 (+1.0%)
R3H (R3H domēnu saturošais proteīns)	9553	9553	9553	9700	+147 (+1.5%)

3. Shēma. Ksantīnoksidāzes katalītiskās aktivitātes izmaiņas pēc apstarošanas.







Secinājumi

- 1. Atskaites periodā tika pētīti ķīmiskie procesi saistīti ar citotoksiskā efekta ģenerēšanu.**
- 2. Pierādīts, ka trialkilstannāna, triptofāna un skābekļa mijiedarbības rezultātā veidojas reakcijspējīgie gaistošie produkti, kuru masa nepārsniedz 200 Da un, kas izplatās zem vāka virs plates virsmas, nomācot šūnu dzīvotspēju.**
- 3. Pētījuma turpinājums 2013. gadā tiks veltīts minēto gaistošo produktu struktūras atšifrēšanai ar nolūku radīt uz to bāzes jauna tipa pretvēža savienojumus.**

Paldies par uzmanību.