

ВИВЧЕННЯ ЦИТОТОКСИЧНОЇ ДІЇ МЕТИЛ-6-АМІНОГЕКСАНОАТ ГІДРОХЛОРИДУ

Сметюх М.П.¹, Соловйов С.О.^{1,2}, Момот А.С.¹, Трохименко О.П.²

¹КПІ ім. Ігоря Сікорського, mykhailo.smetiukh@iit.kpi.ua

²Національний університет охорони здоров'я України ім. П.Л. Шупика

Abstract

This study presents an evaluation of the cytotoxic properties of methyl 6-aminocaproate hydrochloride in vitro using a hamster kidney cell model. Automated image analysis was applied for quantitative assessment of morphological changes and cell viability. The results confirm the efficiency of the implemented algorithm in detecting toxicity markers and demonstrate a stable toxicological profile of the tested compound.

Keywords: methyl 6-aminocaproate hydrochloride, cytotoxicity, BHK-21, image processing, in vitro.

Вступ. Респіраторний синдром, спричинений коронавірусом SARS-CoV-2, призвів до глобальної пандемії COVID-19, яка мала значний вплив на системи охорони здоров'я, економіку та суспільство в цілому. Попри успіхи у створенні вакцин, ефективне лікування на різних стадіях захворювання, особливо з використанням маломолекулярних інгібіторів, залишається актуальною проблемою. Основна протеаза SARS-CoV-2 (Mpro) є ключовим ферментом, необхідним для реплікації вірусу, що робить її привабливою мішенню для противірусної терапії [1]. Тому пошук нових інгібіторів Mpro є важливим напрямом у боротьбі з пандемією та профілактиці потенційних майбутніх спалахів коронавірусної інфекції.

Раніше нами було проведено молекулярне моделювання взаємодії сполуки метил-6-аміногексаноат гідрохлориду з основною протеазою (Mpro) коронавірусу SARS-CoV-2, яка відіграє ключову роль у процесі реплікації та транскрипції вірусного геному [1, 2]. За результатами докінгу встановлено, що ця молекула має високу афінність до активного центру ферменту — енергія зв'язування найстабільнішої конформації становила – 7,12 ккал/моль, що свідчить про наявність сильних міжмолекулярних взаємодій. Аналіз просторової організації комплексу показав, що метил-6-аміногексаноат утворює стабільні водневі зв'язки з амінокислотними залишками Cys145, Asn142 та Gln166, які є критично важливими для каталітичної активності Mpro. Отримані результати вказують на потенційну здатність даної сполуки інгібувати активність основної протеази, що дозволяє розглядати її як перспективний кандидат для подальших досліджень у напрямі розробки противірусних препаратів, спрямованих на пригнічення реплікації SARS-CoV-2.

Важливим наступним кроком є експериментальна оцінка цитотоксичної дії метил-6-аміногексаноат гідрохлориду. Вивчення токсичного впливу на клітини дозволяє встановити діапазон концентрацій, у яких речовина не викликає ушкоджень клітин. Визначення цитотоксичності є важливим початковим етапом доклінічного дослідження нових фармакологічних агентів, зокрема противірусних препаратів. Цей етап дає змогу вчасно виключити сполуки з високим рівнем токсичності, зекономити ресурси, фінанси та час, а також

визначити необхідність подальшої хімічної модифікації речовин для підвищення їхньої безпеки біосумісності.

Отже, метою роботи є вивчення цитотоксичної дії препарату метил-6-аміногексаноат гідрохлориду в умовах *in vitro*.

Матеріали та методи. Оцінку цитотоксичності сполуки метил-6-аміногексаноат гідрохлориду проводили з визначенням показника CD_{50} (цитотоксична доза), що характеризує концентрацію речовини, яка пригнічує ріст клітин на 50 %. Для досліджень використовували перещеплювану лінію клітин нирки сирійського хом'яка – ВНК-21.

Клітини висівали у 96-лункові планшети у посівній концентрації 1×10^6 кл/мл, по 100 мкл на лунку, і культивували при температурі 37°C в атмосфері, насиченій 5 % CO_2 . Після 48 годин інкубації, за наявності сформованого моношару, поживне середовище замінювали на підтримуюче (суміш DMEM та RPMI-1640 у співвідношенні 1:1 із додаванням 100 мкг/мл стрептоміцину), в яке додавали досліджувані препарати у концентраціях 50; 20; 10; 5; 2,5; 1,25 мг/мл (по чотири повтори на кожну концентрацію). Для оцінки змін в клітинному моношарі, додатково проводили автоматизовану обробку зображень клітин з використанням авторського програмного забезпечення, розробленого на мові Python [2, 3].

Зразок готували шляхом розчинення 1,00 г метил-6-аміногексаноат гідрохлориду у 10 мл стерильного фізіологічного розчину з наступною фільтрацією через мембранні фільтри з діаметром пор 0,22 мкм. Через 24 та 48 годин після внесення препарату здійснювали візуальну оцінку стану клітинного моношару, а також розрахунок показника CD_{50} за методом Кербера на основі мікроскопічного аналізу.

Результати та обговорення. Оцінка цитотоксичної дії метил-6-аміногексаноат гідрохлориду в умовах *in vitro* показала виражену токсичність досліджуваної сполуки щодо клітинної лінії ВНК-21. Уже через 24 години експозиції у всіх досліджуваних концентраціях спостерігалось значне порушення цілісності клітинного моношару, що проявлялось дегенеративними змінами клітин, зменшенням їх щільності, а вищі концентрації спричиняли повне руйнування моношару. Навіть мінімальна концентрація сполуки – 1,25 мг/мл помітно викликала морфологічно помітні ушкодження.

Кількісний аналіз цитотоксичності досліджуваної сполуки показав, що значення середньої концентрації, яка знижує життєздатність клітин на 50 %, залишалось стабільним як через 24 години, так і через 48 годин після обробки клітин. Встановлене значення CD_{50} становило 1,10 мг/мл, причому варіації знаходилися в межах від 0,93 до 1,31 мг/мл. Це свідчить про відсутність суттєвих змін у токсичному профілі сполуки протягом досліджуваного часового інтервалу, що вказує на її сталу (незалежну від тривалості експозиції) токсичність у заданому діапазоні концентрацій.

Доповнення до стандартної візуальної оцінки клітинного моношару становила автоматизована обробка мікроскопічних зображень. Цей метод дозволив об'єктивізувати дані щодо стану культури клітин шляхом кількісної

оцінки таких параметрів, як відносна площа покриття клітинами та кількість ідентифікованих клітин.

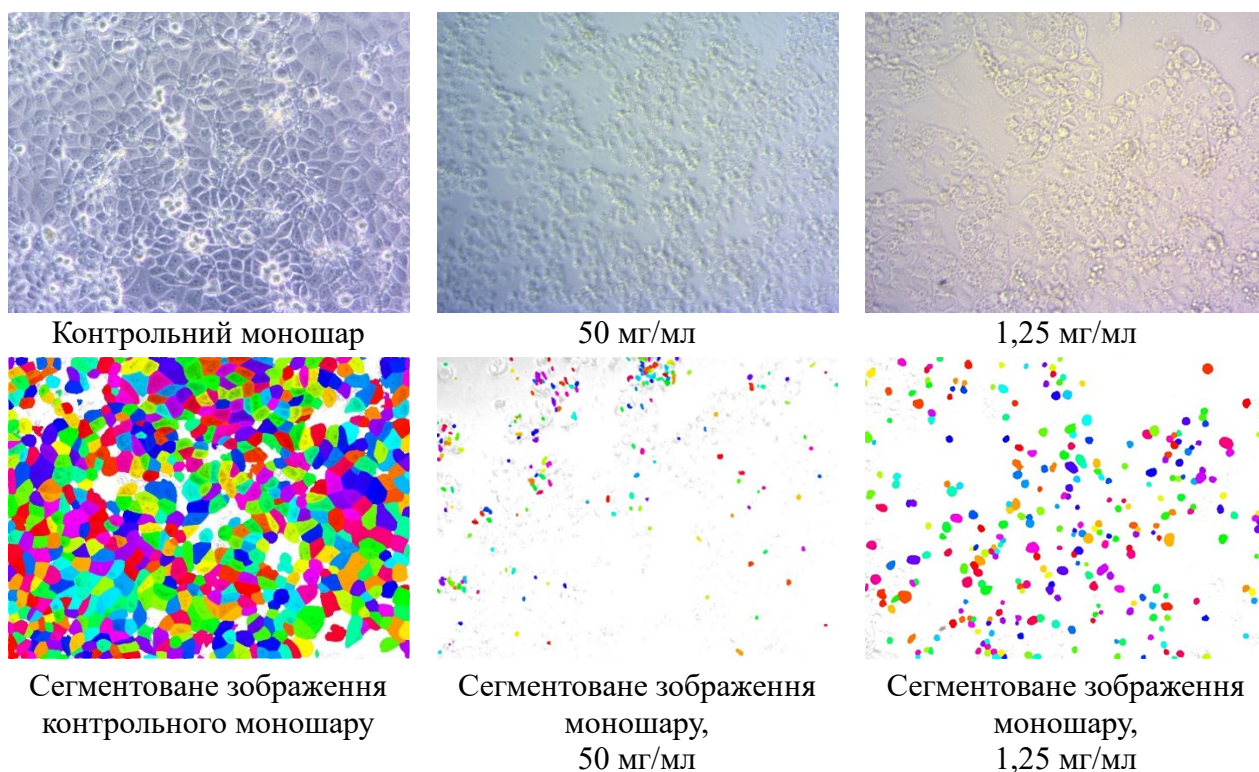


Рис. 1. Зображення клітин ВНК-21.

У контрольному зразку щільність моношару була високою: 89,0 % площі покриття клітин на зображенні при 681 сегментованій клітині, що відповідало морфологічній картині здорової клітинної культури. Це вказує на нормальне функціонування клітин без ознак пошкодження чи стресу. Натомість у дослідному зразку при концентрації 50,0 мг/мл площа покриття клітинами зменшилася до 2 %, а кількість клітин, що розпізнала програма, зменшилася до 88. При найнижчій концентрації 1,25 мг/мл площа, яку займають клітини, зменшилася до 12,0 %, а кількість клітин — до 332, що свідчить про значну втрату популяції. Зниження кількості клітин при зменшенні концентрації також підтверджує дозозалежний ефект токсичності досліджуваної сполуки.

Вірогідною причиною такої вираженої токсичності є наявність хімічних груп у структурі сполуки, здатних неспецифічно взаємодіяти з клітинними мембранами або внутрішньоклітинними мішенями, що призводить до активації апоптозу або некрозу. Зокрема, наявність аміногрупи й метильованого фрагменту може сприяти порушенню клітинної проникності або інгібуванню критичних ензимів [4, 5]. Підтвердженням цієї гіпотези є стійкий рівень CD_{50} в обох часових точках, що свідчить не про поступову активацію токсичності, а про швидку дію, характерну для механізмів прямої цитотоксичності.

Попри високу інформативність та ефективність автоматизованих методів аналізу клітинних зображень, слід зазначити, що такі підходи мають низку обмежень, які можуть впливати на достовірність отриманих результатів. Зокрема, точність алгоритмів сегментації значною мірою залежить від якості вихідних

мікроскопічних знімків, параметрів фокусування, рівня контрастності, а також від типу барвника чи флуорофора, що використовується для візуалізації. Додатковими чинниками є варіабельність морфологічних характеристик клітин, особливо в умовах цитотоксичного впливу, коли спостерігаються зміни форми, розмірів, гранулярності або ступеня адгезії. У зв'язку з цим результати, отримані за допомогою автоматизованої обробки зображень, доцільно розглядати як попередні або орієнтовні. Для підвищення точності оцінки життєздатності клітин і валідації висновків, рекомендовано поєднувати цей підхід із класичними спектрофотометричними методами, такими як МТТ-тест, нейтральний червоний або резазуриновий аналіз. Таке комбіноване застосування дозволяє забезпечити більш надійне та об'єктивне підтвердження результатів, особливо при оцінці токсичності нових хімічних сполук.

Висновки. Результати дослідження демонструють, що метил-6-аміногексаноат гідрохлорид проявляє стійкий цитотоксичний ефект щодо клітинної лінії ВНК-21 навіть при низьких концентраціях. Незалежність CD_{50} від часу експозиції може свідчити про миттєву активацію токсичного шляху, а не про накопичувальну дію. Виявлені властивості вказують на низьку безпечність сполуки в контексті потенційного фармакологічного застосування, зокрема як кандидата на противірусний засіб.

Дослідження підтверджує та наочно демонструє, що первинна токсикологічна оцінка є критично важливою на ранніх етапах скринінгу хімічних речовин, оскільки дозволяє своєчасно виявити несприятливі профілі безпеки, уникнути зайвих ресурсозатрат і зосередити подальші дослідження на більш перспективних структурах.

Список використаної літератури:

1. Structure of Mpro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors / Z. Jin et al. *Nature*. 2020. Vol. 582, no. 7811. P. 289–293. URL: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2223-y>.
2. SARS-CoV-2 Mpro inhibitors and activity-based probes for patient-sample imaging / W. Rut et al. *Nature Chemical Biology*. 2020. URL: <https://doi.org/10.1038/s41589-020-00689-z>.
3. Комп'ютерне моделювання комплексу метил-6-(карбамотіоіламіно)гексаноат з основною протеазою коронавірусу / М. П. Сметюх та ін. *Біотехнологія XXI століття: матеріали XVII Міжнародної науково-практичної конференції*. Київ. 19 травня 2023.
4. Цифрова обробка зображень у дослідженні цитотоксичності γ -аміномасляної кислоти / М. П. Сметюх та ін. *Сучасні досягнення експериментальної, клінічної, екологічної біохімії та молекулярної біології: матеріали I Міжнародної науково-практичної online конференції*.
5. Автоматизована сегментація зображень для визначення чисельності клітин / М. П. Сметюх та ін. *Приладобудування: стан і перспективи: матеріали XXIII Міжнародної науково-технічної конференції*. Київ. 14–15 травня 2024.
6. Methyl jasmonate leads to necrosis and apoptosis in hepatocellular carcinoma cells via inhibition of glycolysis and represses tumor growth in mice / J. Li et al. *Oncotarget*. 2017. Vol. 8, no. 28. P. 45965–45980. URL: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17469>.
7. Methyl 6-aminocaproate hydrochloride - Safety Data Sheet. ChemicalBook. URL: <https://www.chemicalbook.com/msds/methyl-6-aminocaproate-hydrochloride.htm>.