

УДК 57.033: 57.086.835:616-006.61

¹Антакова Л. Н., ¹Шишкина В. В., ¹Герасимова О. А., ^{1,2}Мошуров И. П.,
^{1,2}Коротких Н. В., ²Василенко Д. В., ¹Андреев П. Ю.

ВЛИЯНИЕ ОЗОНИРОВАННОГО ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО РАСТВОРА НА КУЛЬТУРУ КЛЕТОК А431

¹Воронежский государственный медицинский университет имени Н. Н. Бурденко,
Воронеж, Российская Федерация

²Воронежский областной клинический онкологический диспансер, Воронеж,
Российская Федерация

Аннотация. Целью работы является оценка цитотоксичности озонированного физиологического раствора на культуру клеток А431.

Методика исследования заключается в проведении культуральных работ с клетками А431 и оценке влияния озонированного физиологического раствора на их жизнеспособность.

Основные результаты работы показали, что степень повреждения клеточного монослоя, оцененная с помощью тетразолиевого теста, достоверно возросла. Так, отмечено снижение процента жизнеспособных клеток А431 после инкубации с физиологическим раствором, обогащенным озоном (50 мкг/мл), в 1,5 раза и физиологическим раствором, обогащенным озоном (80 мкг/мл), в 1,9 раза по сравнению с физиологическим раствором ($p < 0,05$). Добавление физиологического раствора в культуральную среду не привело к достоверному изменению жизнеспособности клеток и их адгезивным свойствам. Очевидно, озонированный физиологический раствор проявляет дозозависимую цитотоксичность в отношении культуры клеток А431.

Ключевые слова: культура клеток А431, цитотоксичность, озон, физиологический раствор, опухоль.

¹Antakova L. N. , ¹Shishkina V. V. , ¹Gerasimova O. A. , ^{1,2}Moshurov I. P. ,
^{1,2}Korotkih N. V. , ¹Vasilenko D. V. , ¹Andreev P. Yu.

EFFECT OF OZONATED SALINE SOLUTION ON THE A431 CELL LINE

¹ N. N. Burdenko Voronezh State Medical University, Voronezh, Russian Federation

² Voronezh Regional Clinical Oncological Dispensary, Voronezh, Russian Federation

Abstract. The aim of the study is to evaluate cytotoxicity of ozonated saline solution to A431 cell line.

The methodological basis of the present research lied in culturing the A431 cells, which were subsequently treated with ozonated saline solution with following evaluation of related cytotoxic effects.

The main results of the work showed significant increase in the degree of damage of the cellular monolayer, evaluated by the tetrazolium test. The percentage of viable

A431 cells were 1.5-fold reduced after incubation with ozonated saline solution (50 µg/mL), whereas incubation with higher ozone dosage (80 µg/mL) led to 1.9-fold decrease in viable A431 cells, comparing to incubation with normal saline solution ($p < 0.05$). The culture medium, treated by normal physiological solution did not lead to significant changes in the viability of cells and their adhesive properties. Here we suggest that ozonated saline solution might promote dose-dependent cytotoxicity in the A431 cell line.

Keywords: A431 cell line, cytotoxicity, ozone, saline solution, tumor.

ВВЕДЕНИЕ

Биологические эффекты озона основаны на его реакциях с органическими соединениями: водорастворимыми и липофильными антиоксидантами, а также ненасыщенными жирными кислотами, в результате чего генерируются активные формы кислорода [1]. Использование влияния озонированных растворов на клеточные культуры имеет и клиническое применение [2].

Известна модель исследования воздействия озона *in vitro*: культуру клеток цервикальной карциномы HeLa инкубировали в стандартных лабораторных условиях, а затем подвергали обработке газовой смесью O_2/O_3 с содержанием озона 8 ppm (parts per million, частей на миллион) на 4 объема кислорода в течение 5–10 минут [3]. В другом исследовании воздух, содержащий озон в количестве 0,3–0,8 ppm единиц, подавался в камеру с инкубируемыми при температуре 37 °C клеточными культурами в течение 8 дней, в результате был установлен достоверный ингибирующий эффект озона на рост всех бластотрансформированных целлюлярных культур в зависимости от дозы [4]. Так, при насыщении среды озонированным воздухом 0,3–0,5 ppm наблюдалась 40–60%-ная редукция культурального роста [4]. Бластотрансформированные культуры, получившие озоновую экспозицию уровня 0,8 ppm в нагнетаемом воздухе, демонстрировали тенденцию к редуцированному росту более чем на 90%. В то же время линия нормальных фибробластов оставалась интактной в условиях экспозиции озоном в дозе 0,3–0,5 ppm [4]. После 14 пассажей культивирования колонии нормальных фибробластов при экспозиции в дозе 0,5 ppm было установлено, что клетки претерпевают морфологические изменения в виде вакуолизации, а также градуальное замедление их митотической активности [4]. Описанные эффекты авторы исследования связали с клеточным старением нормальных фибробластов [4]. В культурах клеток овариальной карциномы минимальная доза озона 0,03 ppm оказывала цитостатическое воздействие, в то время как в дозах 0,1 и 0,3 ppm озон проявлял цитотоксические свойства [5].

Широко известная культура клеток цервикальной карциномы HeLa инкубировалась во влажной среде при 37 °C и 5% CO_2 до получения конфлюэнтного слоя культуры, после чего обрабатывалась трипсином и субкультивировалась [6]. Максимальная доза озона (40 мкг/мл) сопровождалась наиболее выраженным проапоптогенным влиянием [6].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на базе НИИ экспериментальной биологии и медицины федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный медицинский уни-

верситет имени Н. Н. Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Использовали клеточную линию эпидермоидной карциномы человека A431, полученную в Центре коллективного пользования «Коллекция культур клеток позвоночных» федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии Российской академии наук (ЦКП КККП ИНЦ РАН), Санкт-Петербург, Россия (рис. 1). Клетки культивировались в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ инкубатор Midi 40 (Thermo Scientific, США) при 37 °С. Все манипуляции проводились в боксе БМБ-II-«Ламинар-С»-1,2 (Lamsystems, Россия). Пассажи клеток осуществляли в 24-луночные планшеты (Orange Scientific, Бельгия) в количестве 6 × 10⁴ клеток/см³ на 1 лунку и в пластиковые флаконы S = 25 см² (Orange Scientific, Бельгия) в количестве 6 × 10⁴ клеток. Для культивирования использовали питательную среду DMEM (ООО «БиолоТ», Россия) содержащую L-глутамин, 1 г/л глюкозы, и перед пассажем добавляли 10%-ную сыворотку крови плодов коровы (ООО «БиолоТ», Россия). Через 1 сутки проводили замену ростовой питательной среды на поддерживающую бессывороточную среду, содержащую изучаемые растворы (соотношение 1:1): физиологический раствор; физиологический раствор, обогащенный озоном (50 и 80 мкг/мл) и через 24 часа оценивали жизнеспособность клеток. Для фотодокументации использовали инвертированный микроскоп Nikon ECLIPSE Ts2, камеру ММС-31С12-М с программным обеспечением.

Приготовление физиологического раствора (0,89%-ный раствор хлорида натрия для культуры клеток, ООО «БиолоТ», Россия), обогащенного озоном, осуществляли на аппарате озонотерапии «МЕДОЗОНС-БЬЮТИ» (ООО «НПП ЭлектроГидроСистемы», Россия) с применением устройства для озонирования воды, растворов, масел (ООО «ОТРИ», Россия), деструктора отработанной озонкислородной смесью (ООО «ОТРИ», Россия) и концентратора кислорода «Oxygen concentrator Longfian JAY-5A» (Longfian scitech Co., ltd.) согласно руководству по эксплуатации ВСАТ.941137.001РЭ, ФПИК.944001.003.РФ, НПКУ.941713.001 и JAGZ03-01 соответственно.

Степень повреждения клеточного монослоя оценивали с помощью тетразолиевого теста [7]. После инкубации с исследуемыми физиологическими растворами клетки отмывали питательной средой и добавляли в каждую лунку по 100 мкл 0,5%-ного раствора нитросинего тетразолия (лот: 19512, Диа-М, Россия) и инкубировали 2 часа в условиях 37 °С увлажненной атмосферы с 5% CO₂. После чего среду отбирали, в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора диметилсульфоксида (ДМСО, ООО «БиолоТ», Россия) и экстрагировали образовавшийся формазан [7]. Оптическую плотность полученного раствора формазана в ДМСО измеряли на спектрофотометре Multiscan GO (Thermo Fisher Scientific Oy, Финляндия) при длине волны 535 нм. За 100% жизнеспособности принимали интенсивность окраски в лунках с клетками, не обработанными исследуемыми физиологическими растворами.

Определение жизнеспособности клеток при воздействии физиологического раствора и физиологического раствора, обогащенного озоном (50 и 80 мкг/мл) проводили с помощью теста с трипановым синим, который проникает в клетки с поврежденной мембраной [8, 9]. Для снятия клеток использовали раствор трипсина-версена (ООО «БиолоТ», Россия) в количестве 1:3 соответственно паспор-

ту клеток и рекомендациям [8]. Клетки отмывали питательной средой DMEM (ООО «БиолоТ», Россия) и центрифугировали в течение 10 минут при 1000 об/мин на центрифуге LMC-3000 (BioSan, Латвия). Осадок ресуспензировали в питательной среде до достижения в количестве 3×10^6 кл/см³. Для определения цитотоксичности исследуемых растворов к суспензии клеток добавляли в равном объеме физиологический раствор, физиологический раствор, обогащенный озоном (50 и 80 мг/мл), и инкубировали 10 минут при температуре 37 °С. К 10 мкл клеточной суспензии добавляли равный объем 0,4%-ного раствора трипанового синего (ООО «БиолоТ», Россия) из расчета и осуществляли подсчет количества клеток на автоматическом счетчике клеток ТС 20 (Bio-Rad, Сингапур) [9]. Для статистической обработки данных использовалась программа Statistica 12.0. Для оценки достоверности различий использован параметрический t-критерий Стьюдента.

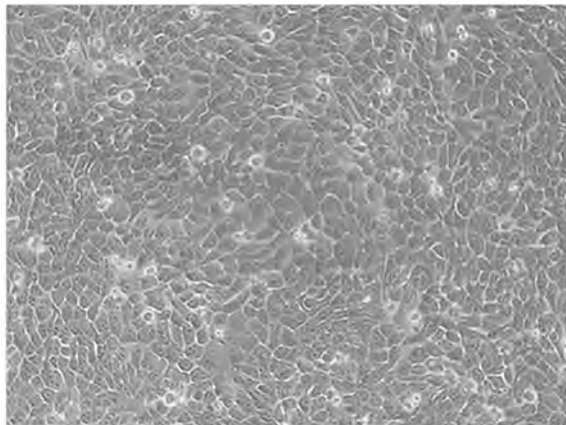


Рис. 1. Монослойная клеточная линия А431 (человек, эпидермоидная карцинома), полученная в Центре коллективного пользования «Коллекция культур клеток позвоночных» федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии Российской академии наук (ЦКП КККП ИНЦ РАН), Санкт-Петербург, Россия. Nikon ECLIPSE Ts2, Ув. 10× (Поле зрения: 22)

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка роста клеточной культуры после замены питательной среды на среду, содержащую изучаемые растворы (соотношение 1:1): физиологический раствор; физиологический раствор, обогащенный озоном (50 и 80 мкг/мл), показала изменение адгезивных свойств клеток при добавлении исследуемых растворов (*рис. 2*).

Оценка степени повреждения клеточного монослоя с помощью тетразолиевого теста выявило достоверное снижение процента жизнеспособных клеток А431 после инкубации с физиологическим раствором, обогащенным озоном (50 мкг/мл), в 1,5 раза и физиологическим раствором, обогащенным озоном (80 мкг/мл), в 1,9 раза по сравнению с физиологическим раствором ($p < 0,05$). Добавление физиологического раствора в культуральную среду не привело к достоверному изменению жизнеспособности клеток и их адгезивному состоянию.

Определение жизнеспособности клеток с трипановым синим показало снижение процента живых клеток (*табл. 1*).

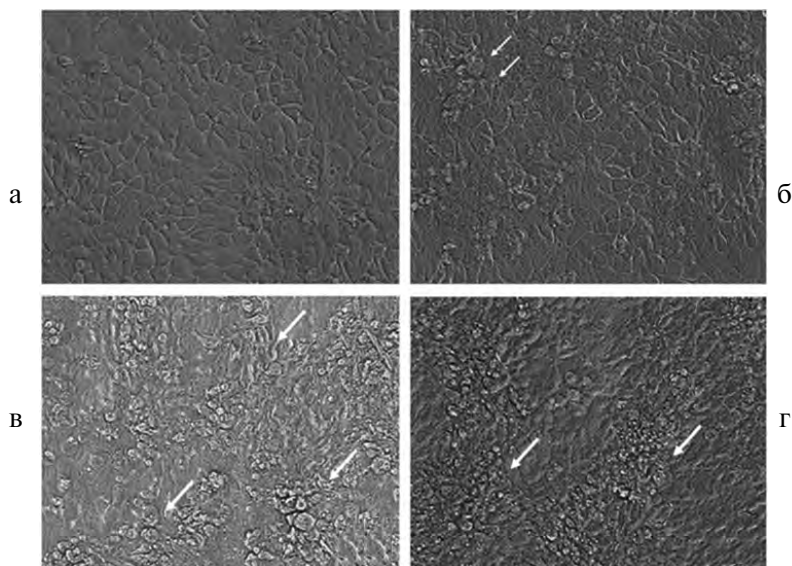


Рис. 2. Оценка роста клеточной культуры после замены питательной среды на поддерживающую бессывороточную среду, содержащую изучаемые растворы (соотношение 1:1). Инкубация 24 часа. Ув. 10× (Поле зрения: 22): а — интактная культура; б — физиологический раствор; в — физиологический раствор, обогащенный озоном (50 мкг/мл); г — физиологический раствор, обогащенный озоном (80 мкг/мл). Стрелочками показаны клетки, утратившие адгезивную способность

Таблица 1

ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧЕСТВА ОКРАШИВАНИЕМ ТРИПАНОВЫМ СИНИМ

Наименование групп	Количество живых клеток, %
Интактные	99,66 ± 2,3
Физиологический раствор	97,37 ± 4,6
Физиологический раствор, обогащенный озоном (50 мкг/мл)	71,48 ± 4,6*
Физиологический раствор, обогащенный озоном (80 мкг/мл)	60,55 ± 4,5*

* — уровень достоверности ($p < 0,05$) по отношению к влиянию физиологического раствора.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что физиологический раствор, обогащенный озоном (50 и 80 мкг/мл), проявляет цитотоксические свойства. Также было отмечено изменение адгезивных свойств клеток линии A431, что может свидетельствовать об изменении некоторых реактивных характеристик данных клеток при добавлении описанных растворов. Таким образом, физиологический раствор, обогащенный озоном (50 и 80 мкг/мл), может быть рассмотрен к применению в терапии эпидермоидной карциномы на анимальных моделях.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Bocci V.* Oxygen-Ozone Therapy. A Critical Evaluation. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publisher, 2002. P. 121–314.
2. *Кузьменко В. В., Авдеев А. И.* Влияние озонированных растворов на микрофлору мочи у больных острым деструктивным пиелонефритом // Научно-медицинский вестник Центрального Черноземья. 2003. № 13. С. 107–110.
3. *Fetner R. H.* Ozone-induced chromosome breakage in human cell cultures. *Nature*. 1962; 194:793–794. DOI: 10.1038/194793a0
4. *Sweet F., Kao M. S., Lee S. C., Hagar W. L., Sweet W. E.* Ozone selectively inhibits growth of human cancer cells. *Science*. 1980; 209(4459):931–933. DOI: 10.1126/science.7403859
5. *Karlic H., Kucera H., Metka M., Schönbauer M., Söregi G.* Zur Wirkung von Ozon und ionisierender Strahlung am In-vitro-Modell-eine Pilotstudie an vier gynäkologischen Tumoren [Effect of ozone and ionizing radiation on an in vitro model-a pilot study of 4 gynecologic tumors]. *Strahlenther Onkol*. 1987; 163(1):37–42.
6. *Mary V. M., Lahijani H. A., Khan F. A.* Ozone Induced Cell Death in HeLa cell Culture Mediated through Stimulation of TNF-Alpha. *MOJ Immunol*. 2015; 2(4):51. DOI: 10.15406/moji.2015.02.00051
7. *Синегубова Е. О., Дубровина И. А., Мясников В. А.* Комплексный подход к оценке цитотоксичности рибосом-инактивирующих белков на клеточной модели in vitro // Медицина экстремальных ситуаций. 2019. № 1. С. 167. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/kompleksnyy-podhod-k-otsenke-tsitotoksichnosti-ribosom-inaktiviruyuschih-belkov-na-kletochnoy-modeli-in-vitro> (дата обращения: 22.05.2023).
8. Методическое пособие по работе с клеточными культурами человека и животных / Г. Г. Полянская, Т. Н. Ефремова, А. М. Кольцова, А. С. Мусорина, Н. С. Шарлаимова, Т. К. Яковлева. СПб.: ПОЛИТЕХ-ПРЕСС, 2019. 114 с.
9. *Прилепский А. Ю., Дроздов А. С., Богатырев В. А., Староверов С. А.* Методы работы с клеточными культурами и определение токсичности наноматериалов. СПб.: Университет ИТМО, 2019. 43 с. URL: <https://books.ifmo.ru/file/pdf/2501.pdf> (дата обращения: 23.05.2023).