

ВЛИЯНИЕ КИСЛОРОДСОДЕРЖАЩИХ СУБСТАНЦИЙ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

М. Ю. Русак¹, А. Е. Гуляев^{1,2}, Ю. Э. Русак¹, Е. Н. Ефанова¹

¹ Сургутский государственный университет, Сургут, Россия

² Назарбаев Университет, Нур-Султан, Республика Казахстан

Цель – исследование возможного влияния кислородсодержащих субстанций, используемых в практике дерматологии и косметологии, на жизнеспособность культуры клеток при инкубации в условиях *in vitro*. **Материал и методы.** Проведено экспериментальное исследование по выявлению цитопротекторной способности кислородсодержащего бальзама с применением для оценки жизнеспособности клеток МТТ-теста, ключевым компонентом которого является использование солей тетразолия в виде бромида 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия с восстановлением до формазана в присутствии метаболически активных клеток. В качестве клеточной культуры использовали перевиваемую культуру клеток HEK293 (human embryonic kidney, ATCC® CRL-1573™) – клетки почки эмбриона человека; доxorубин применялся как стандарт цитотоксической субстанции. Жизнеспособность клеток в исследуемых средах оценивали путем измерения оптической плотности окрашенных растворов спектрометрическим методом при длине волны 580 нм с последующей статистической обработкой результатов. **Результаты.** Установлена способность кислородсодержащего бальзама с 20 %-м кислородным комплексом NOVAFNEM-O2 в разведении 1:10 предупреждать снижение жизнеспособности изолированных клеток в присутствии цитотоксического агента доxorубина.

Ключевые слова: МТТ-тест, кислородсодержащие субстанции, цитопротекторная способность.

Шифр специальности: 14.03.03 Патологическая физиология;

14.01.10 Кожные и венерические болезни.

Автор для переписки: Русак Юрий Эдуардович, e-mail: profrusak@mail.ru

98

ВВЕДЕНИЕ

Общепризнанный факт, что условием поддержания нормального состояния и жизнедеятельности клеток является кислородное обеспечение тканей, которое осуществляется в митохондриях в процессе

биохимического окисления питательных компонентов. Процесс обмена газов, так называемое «тканевое дыхание», происходит в клетках организма в результате ряда окислительно-восстановительных реакций пи-

INFLUENCE OF OXYGEN-CONTAINING SUBSTANCES ON VIABILITY OF CELL CULTURE IN EXPERIMENT

M. Yu. Rusak¹, A. E. Gulyaev^{1,2}, Yu. E. Rusak¹, E. N. Efanova¹

¹ Surgut State University, Surgut, Russia

² Nazarbayev University, Nur-Sultan, Republic of Kazakhstan

The study aims to investigate the cytoprotective ability of oxygen-containing substances used in dermatology and cosmetology on the viability of cell culture during incubation *in vitro*. **Material and methods.** An experimental study to identify the cytoprotective ability of an oxygen-containing balm using the MTT assay is conducted. The key component of this assay is the use of tetrazolium salts in the form of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide which are reduced to formazan in the presence of metabolically active cells. The transplantable cells HEK293 (human embryonic kidney, ATCC® CRL-1573™) are used as cell culture, and doxorubicin is used as a standard cytotoxic substance. Cell viability in the studied media is evaluated by measuring the optical density of the stained solutions by a spectrophotometer at a wavelength of 580 nm, followed by statistical processing of the results. **Results.** The ability of an oxygen-containing balm containing 20% of the NOVAFNEM-O2 oxygen complex at a dilution of 1:10 to prevent a decrease in the viability of isolated cells in the presence of the cytotoxic agent doxorubicin is established.

Keywords: MTT assay, oxygen-containing substances, cytoprotective ability.

Code: 14.03.03 Pathophysiology;

14.01.10 Skin and Venereal Diseases.

Corresponding Author: Yuri E. Rusak, e-mail: profrusak@mail.ru

тательных веществ и продуктов метаболизма за счет поглощения клетками кислорода с выделением конечных продуктов [1–2]. Транспорт кислорода к клеткам осуществляется путем диффузионных проникновений через клеточные мембраны, интенсивность такого газообмена зависит от плотности капилляров, на которую могут влиять различные патологические процессы. Дефицит кислорода в тканях может приводить к нарушениям обмена веществ в клетках [3].

В дерматологической практике для лечения многих заболеваний кожи применяют аппаратные методы, механизм действия которых напрямую связан с балансом свободного кислорода, т. е. с его содержанием и потреблением: методы ультрафиолетового облучения (УФО) способствуют росту процесса потребления тканями кислорода, приводят к снижению содержания кислорода за счет усиления его метаболизма в здоровой коже. Искусственный дефицит кислорода в коже блокирует образование эритемы и пигментации при фототерапии [4].

Напротив, при высоком содержании кислорода в коже ее фоточувствительность увеличивается. Различные методы повышения показателей содержания кислорода в коже способствуют более эффективному лечению кожных заболеваний.

Цель – исследование возможного влияния кислородсодержащих субстанций, используемых в практике дерматологии и косметологии, на жизнеспособность культуры клеток при инкубации в условиях *in vitro*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объект исследования: кислородный бальзам (Faberlic). Разведение в среде DMEM 1:10 и 1:100.

Перевиваемая клеточная культура. Использовали культуру клеток HEK293 (human embryonic kidney, ATCC® CRL-1573™) – клетки почки эмбриона человека. Клетки выращивали в среде DMEM с добавлением 10 %-й эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамина, 1 %-го гентамицина при 37 °С в атмосфере CO₂ (5 %). К культуре клеток были добавлены тестируемые соединения – кислородный бальзам в разведениях 1:10 и 1:100; доксорубин в конечной концентрации 1 мкг/мл и 10 мкг/мл; доксорубин 10 мкг/мл + кислородный бальзам (разведение 1:10); контроль – клетки без добавления исследуемой субстанции. Затем клетки культивировали при тех же условиях в течение 48 часов. Для каждой концентрации проведена опытная серия экспериментов, включающая пять повторений. Доксорубин представляет собой цитотоксический антрациклиновый антибиотик, выделенный из культуры *Streptomyces peucetius* var. *Caesius*. Он одобрен для медицинского использования в США в 1974 г. (The American Society of Health-System Pharmacists, 11 октября, 2016), относится к Перечню основных лекарственных средств Всемирной организации здравоохранения, используется как один из известных противоопухолевых агентов для оценки цитотоксичности различных химических препаратов в процессе проведения МТТ-теста – метода оценки жизнеспособности клеток и их метаболической активности [5].

В качестве кислородсодержащей субстанции тестировали бальзам (Faberlic) с 20 %-м кислородным комплексом NOVAFNEM-O₂, а также вещества с выраженной способностью увеличения содержания влаги, транспорта кислорода в слои кожи (perfluorodecalin,

arginine), опосредованно улучшающие трофику дермы (*Chlorella vulgaris*) и др.

Оценку пролиферативной активности и выживаемости клеток проводили с использованием МТТ-теста в соответствии со стандартом операционных процедур (СОП), основанным на инструкции производителя «*In vitro toxicology Assay kit MTT based*» (Sigma). Принцип МТТ-теста основан на способности дегидрогеназ живых клеток восстанавливать неокрашенные формы МТТ-реагента (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразола) до голубого кристаллического формазана, который хорошо растворим в диметилсульфоксиде.

Коэффициент поглощения цветного раствора выражали количественно путем измерения при длине волны 550 нм методом спектрофотометрии (Evolution 201 Thermo Scientific). Жизнеспособность клеток в контроле (клетки без добавления исследуемых субстанций) принимали за 100 %. Выживаемость клеток HEK293 (%) в присутствии тестируемых веществ рассчитывали по формуле:

$$N = \frac{D1 - D2}{D3 - D2} * 100 \% \quad (1),$$

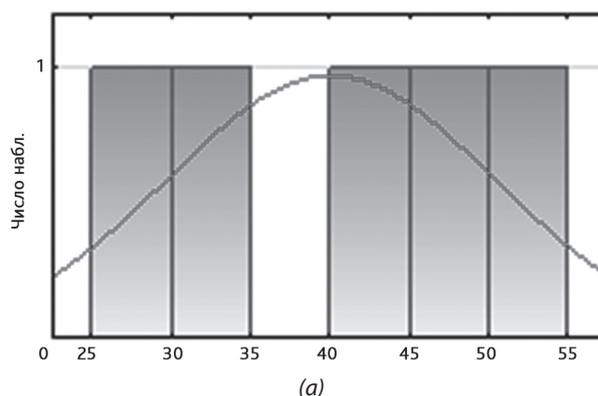
где N – число выживаемых клеток HEK293 (%), D1 – оптическая плотность исследуемых сред в опытных лунках; D2 – оптическая плотность контрольного раствора (фоновое поглощение), D3 – оптическая плотность исследуемых сред в контрольных лунках.

Статистическая обработка материала исследования включала предварительное тестирование экспериментальных данных на соответствие закону нормальности распределения величин с использованием критерия Шапиро – Уилка (с поправкой Лиллиефорса), выбор и применение которого обосновано малым объемом выборки – $3 > n < 50$. Статистическая значимость различий выполнена с использованием критерия Манна – Уитни (Рm), достоверность которого принималась на уровне значимости $p < 0,005$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка результатов экспериментальных данных по исследованию выживаемости культуры клеток в тестируемых средах – кислородсодержащей субстанции (бальзаме) в разведениях 1:100 и 1:10, растворе доксорубина с концентрацией 1 мкг/л и 10 мкг/л, а также смеси доксорубина (10 мкг/л) с кислородсодержащим бальзамом (в разведении 1:10) – продемонстрировала отличие от нормального закона распределения величин (Гауссовское распределение), что иллюстрирует рисунок 1.

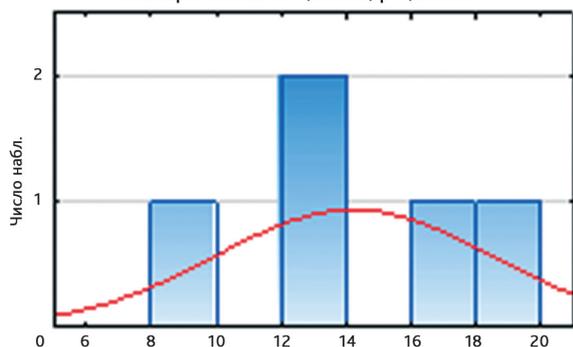
Кислородсодержащий бальзам: 1:100
 К-С $d = ,26912$, $p > ,20$; Лиллиефорса $p > ,20$
 Шапиро-Уилка $W = ,85811$, $p = ,22156$



Кислородосодержащий бальзам: разведение 1:100

К-С $d=,19471$, $p=,20$; Лиллиефорса $p=,20$

Шапиро-Уилка $W=,97190$, $p=,88732$

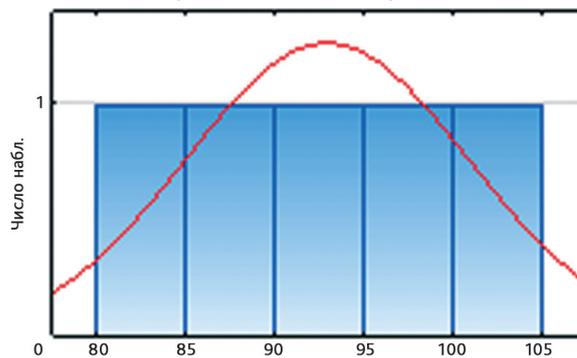


(б)

Доксорубин, 1 мкг/мл

К-С $d=,21457$, $p>,20$; Лиллиефорса $p>,20$

Шапиро-Уилка $W=,96182$, $p=,82062$

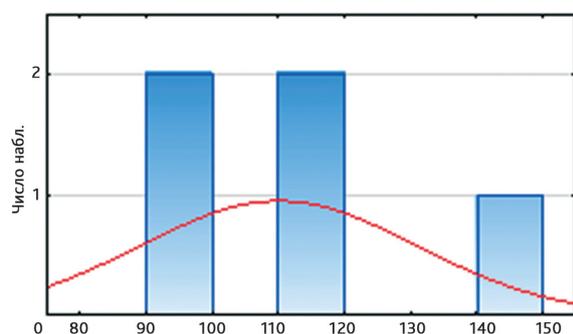


(е)

Доксорубин, 10 мкг/мл

К-С $d=,21268$, $p>,20$; Лиллиефорса $p>,20$

Шапиро-Уилка $W=,89749$, $p=,39619$

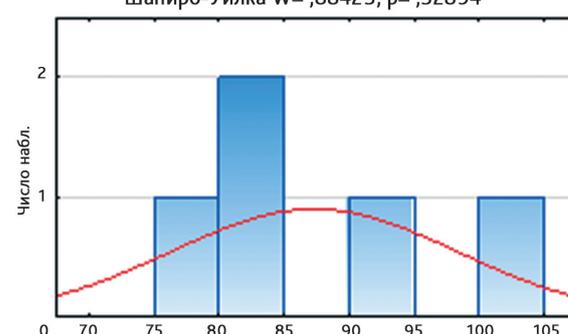


(z)

Доксорубин, 10 мкг/мл + кислородосодержащий бальзам 1:10

К-С $d=,29807$, $p>,20$; Лиллиефорса $p<,20$

Шапиро-Уилка $W=,88423$, $p=,32894$



(д)

Рис. 1. Иллюстрация результатов графической проверки экспериментальных данных жизнеспособности клеток на соответствие закону нормального распределения величин с использованием критерия Шапиро – Уилка: (а) – кислородосодержащий бальзам в разведении 1:100; (б) – кислородосодержащий бальзам в разведении 1:10; (в) – доксорубин, 1 мкг/мл; (z) – доксорубин, 10 мкг/мл; (д) – доксорубин, 10 мкг/мл в сочетании с кислородосодержащим бальзамом в разведении 1:10

Результаты исследования изменения жизнеспособности в МТТ-тесте изолированных клеток в условиях *in vitro* воздействия кислородного бальзама

представлены в таблице, результирующие значения приведены в виде медианы и интерквартильного размаха.

Таблица

Влияние кислородного бальзама на жизнеспособность клеток НЕК293

Параметр	Исследуемые субстанции				
	Кислородосодержащий бальзам		Доксорубин, 1 мкг/мл	Доксорубин, 10 мкг/мл	Доксорубин 10 мкг/мл + кислородосодержащий бальзам 1:10
	Разведение 1:100	Разведение 1:10			
Относительные значения жизнеспособности, в % от контроля (CV (НЕК293), %)	96,1	142,4	30,2	13,2	103,5
	89,2	110,5	44,6	8,5	80,6
	104,7	92,0	28,0	19,6	77,1
	83,9	90,7	47,2	12,8	93,8
	90,6	114,7	50,5	17,0	81,6
M (‰75÷‰25)	90,6 (89,2÷96,1)	110,5 (92,0÷114,7)	44,6 (30,2÷47,2)	13,2 (12,8÷17,0)	81,6 (80,6÷93,8)
P_M	*0,00000005	*0,000009	*0,00082		*0,0000007

Примечание: * статистически значимые различия с применением критерия Манна – Уитни (P_M) по отношению к значению жизнеспособности клеток в присутствии доксорубина (C = 10 мкг/мл) на уровне $p < 0,05$; M – значение медианы, 25 % ÷ 75 % – интерквартильный размах.

Как следует из полученных данных (табл.), при инкубации эпителиальных клеток перевиваемой клеточной культуры кислородный бальзам в разведениях 1:100 не проявляет цитотоксического действия, а в разведении 1:10 в некоторой степени поддерживает жизнеспособность клеток.

Основываясь на эмпирической графической зависимости кривой доксорубицина «доза–зависимость», определена величина эффективной концентрации, ингибирующая рост популяции культуры клеток (IC50) в размере 50 % (рис. 2).

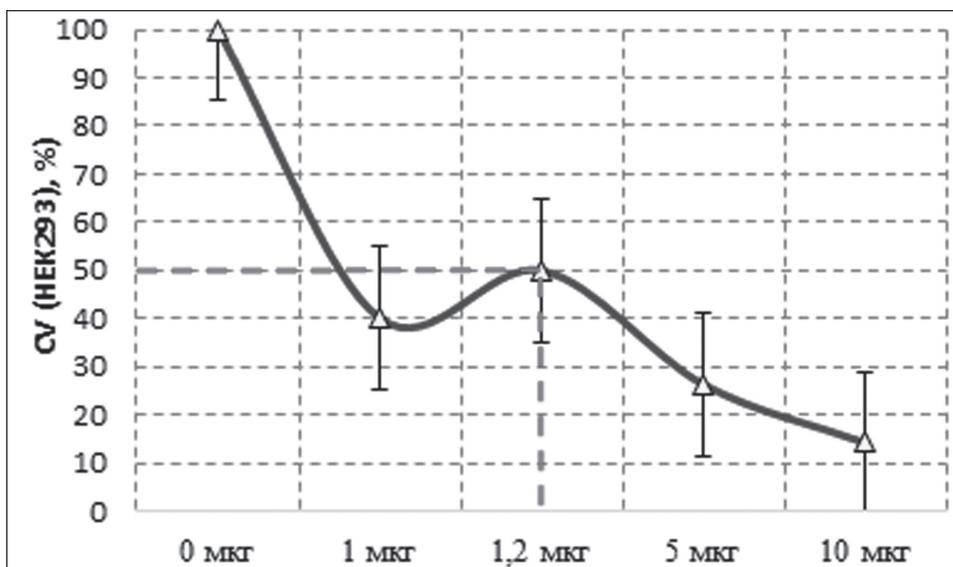


Рис. 2. Дозозависимая кривая доксорубицина в отношении культуры клеток HEK293

Примечание: на графике вертикальными линиями обозначены пределы стандартной погрешности.

Способность кислородного бальзама предохранять клетки от воздействия цитотоксических эффектов наглядно выявляется в экспериментах с доксорубицином. Доксорубицин как стандарт цитотоксической субстанции ингибирует жизнеспособность клеток перевиваемой культуры в значительной степени, но добавление исследуемой субстанции «кислородный бальзам» в среду инкубации принципиально меняет положение: клетки теряют жизнеспособность под действием доксорубицина в достоверно меньшей степени (рис. 3).

ваемой культуры в значительной степени, но добавление исследуемой субстанции «кислородный бальзам» в среду инкубации принципиально меняет положение: клетки теряют жизнеспособность под действием доксорубицина в достоверно меньшей степени (рис. 3).

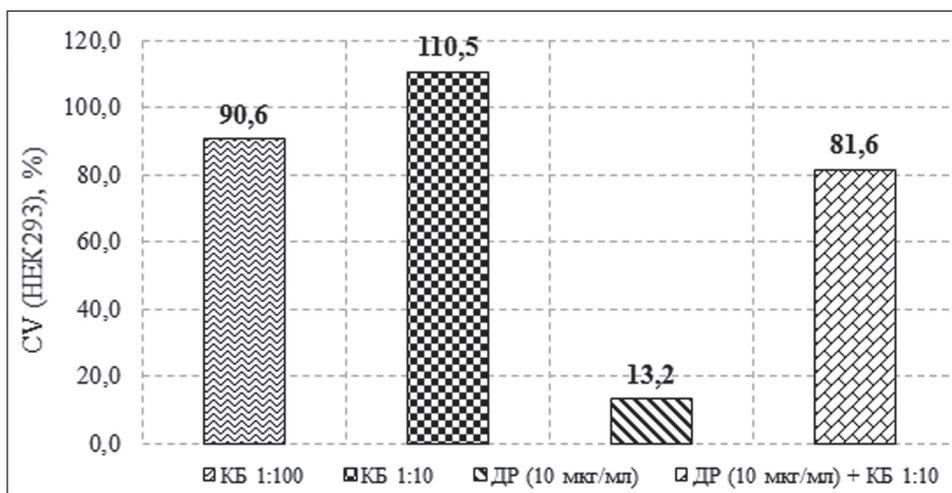


Рис. 3. Изменение жизнеспособности в МТТ-тесте изолированных клеток HEK293 в условиях *in vitro* воздействия кислородного бальзама: КБ – кислородный бальзам в разведении 1:10 и 1:100; ДР – доксорубицин

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, при инкубации в течение 48 часов клеток перевиваемой культуры с кислородным бальзамом выявлена способность исследуемой субстанции предупреждать снижение жизнеспособности изолированных клеток в присутствии цитотоксического агента. Полученные результаты дают основания для предположения о наличии цитопротекторного

потенциала у исследуемой субстанции «кислородный бальзам». Применение кислородсодержащих субстанций при псориазе и других хронических дерматозах является перспективным направлением повышения эффективности лечения методами фототерапии [6–7].

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

1. Фундаментальная и клиническая физиология / под ред. А. Г. Камкина, А. А. Каменского. М. : Академия, 2004. 1072 с.
2. Сонькин В. Д., Тамбовцева Р. В. Развитие мышечной энергетики и работоспособности в онтогенезе. М. : Книжный дом : Либроком, 2011. 368 с.
3. Данне М. К. Кислородная терапия кожи с точки зрения биологической науки, клинической практики и косметического маркетинга // Косметика и медицина. 2017. № 1. С. 16–24.
4. Русак Ю. Э., Ефанова Е. Н., Русак М. Ю. Влияние селективной фототерапии на динамику свободного кислорода в коже у больных псориазом // Современ. проблемы науки и образования. 2019. № 6. URL: <http://www.science-education.ru/article/view?id=29328> (дата обращения: 27.11.2019).
5. СТП-14.621.21.0008.12-2015. Методика определения цитотоксичности веществ МТТ-тестом на культуре нормальных клеток человека HEK293. URL: http://www.ipac.ac.ru/docs/ckp/metod_17.pdf (дата обращения: 10.04.2020).
6. Русак С. Н., Ефанова Е. Н., Русак М. Ю., Горшкова А. В. Применение кислородсодержащей эмульсии для повышения оксигенации кожи // Вестник СурГУ. Медицина. 2018. № 2 (36). С. 74–79.
7. Гречканева О. А., Биткина О. А., Перетягин П. В., Габасов И. В., Разжева П. А. Использование метода лазерной доплероскопической флоуриметрии для оценки эффективности наружных озонид-препаратов // Биорадикалы и антиоксиданты. 2017. Т. 4, № 4. С. 16–25.

1. Fundamentalnaya i klinicheskaya fiziologiya / Eds. A. G. Kamkina, A. A. Kamenskogo. Moscow: Akademiya, 2004. 1072 p. (In Russian).
2. Sonkin V. D., Tambovceva R. V. Razvitie myshechnoj energetiki i rabotosposobnosti v ontogeneze. Moscow : Knizhnyi dom : Librokom, 2011. 368 p. (In Russian).
3. Danne M. K. Oxygen Skin Therapy in Terms of Biological Science, Clinical Practice and Cosmetic Marketing // Cosmetics and Medicine. 2017. No. 1. P. 16–24. (In Russian).
4. Rusak Yu. E., Efanova E. N., Rusak M. Yu. The Effect of Selective Phototherapy on the Dynamics of Free Oxygen in the Skin in Patients with Psoriasis // Modern Problems of Science and Education. 2019. No. 6. URL: <http://www.science-education.ru/article/view?id=29328> (accessed: 27.11.2019). (In Russian).
5. STP-14.621.21.0008.12-2015. Method for determination of cytotoxicity of substances by MTT test on a culture of normal human cells HEK293. URL: http://www.ipac.ac.ru/docs/ckp/metod_17.pdf (accessed: 10.04.2020). (In Russian).
6. Rusak S. N., Efanova E. N., Rusak M. Yu., Gorshkova A. V. Administration of Oxygen-Containing Emulsion for Better Skin Oxygenation // Vestnik SurGU. Medicina. 2018. No. 2 (36). P. 74–79. (In Russian).
7. Grechkaneva O. A., Bitkina O. A., Peretyagin P. V., Gabasov I. V., Razheva P. A. Using the Laser Doppler Method of Fluorimetry to Assess the Effectiveness of External Ozonide Preparations // Bioradicals and antioxidants. 2017. Vol. 4. No. 4. P. 16–25. (In Russian).

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Русак Марина Юрьевна – аспирант кафедры многопрофильной клинической подготовки, Медицинский институт, Сургутский государственный университет, Сургут, Россия.

E-mail: marina_19.92@mail.ru

Гуляев Александр Евгеньевич – доктор медицинских наук, профессор, Назарбаев Университет, Нур-Султан, Республика Казахстан; главный научный сотрудник Научно-образовательного центра, Сургутский государственный университет, Сургут, Россия.

E-mail: akin@mail.ru

Русак Юрий Эдуардович – доктор медицинских наук, профессор кафедры многопрофильной клинической подготовки, Медицинский институт, Сургутский государственный университет, Сургут, Россия.

E-mail: profrusak@mail.ru

Ефанова Елена Николаевна – кандидат медицинских наук, доцент кафедры многопрофильной клинической подготовки, Медицинский институт, Сургутский государственный университет, Сургут, Россия.

E-mail: el.efanova2011@yandex.ru

ABOUT THE AUTHORS

Marina Yu. Rusak – Postgraduate, Multidisciplinary Clinical Education Department, Medical Institute, Surgut State University, Surgut, Russia.

E-mail: marina_19.92@mail.ru

Aleksandr E. Gulyaev – Doctor of Sciences (Medicine), Professor, Nazarbayev University, Nur-Sultan, Republic of Kazakhstan; Chief Researcher, Research and Educational Center, Surgut State University, Surgut, Russia.

E-mail: akin@mail.ru

Yuri E. Rusak – Doctor of Sciences (Medicine), Professor of the Multidisciplinary Clinical Education Department, Medical Institute, Surgut State University, Surgut, Russia.

E-mail: profrusak@mail.ru

Elena N. Efanova – Candidate of Sciences (Medicine), Associate Professor, Multidisciplinary Clinical Education Department, Medical Institute, Surgut State University, Surgut, Russia.

E-mail: el.efanova2011@yandex.ru