МОРФОЛОГИЯ И ПАТОФИЗИОЛОГИЯ MORPHOLOGY AND PATHOPHYSIOLOGY

DOI: 10.29413/ABS.2018-3.6.6

УДК 602.42-7:576.3:615.076

Трухан И.С., Дремина Н.Н., Лозовская Е.А., Шурыгина И.А.

Оценка потенциальной цитотоксичности в рамках прижизненного наблюдения на BioStation CT

ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии»
(664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1, Россия)

Резюме

В последние десятилетия большую актуальность для медицинских и фармацевтических исследований приобретают методы, основанные на клеточных технологиях. В данной работе было рассмотрено применение BioStation CT для непрерывного прижизненного наблюдения за культурой клеток асцитной карциномы Эрлиха в условиях воздействия разными концентрациями двух активных веществ (от 1,25 до 20 мг/л). В результате мониторинга состояния клеток карциномы в течение 4,5 суток было показано, что вещество № 2 не оказывает влияние на жизнеспособность клеток, тогда как вещество № 1 вызывает их гибель. При этом воздействие данного активного вещества имеет дозозависимый характер. Фотодокументирование с интервалом в 2 часа позволило проследить различия в скорости разрушения клеток (интенсивная утрата целостности в первые сутки с дальнейшей стабилизацией числа живых клеток или постепенной дезинтеграцией клеток на протяжении всего эксперимента), а также различия во времени достижения 50 %-й гибели. Таким образом, в процессе исследования было продемонстрировано, что BioStation CT является перспективным оборудованием для токсикологических исследований и значительно расширяет возможности детектирования процессов, происходящих с живыми клетками, за достаточно протяжённый период времени. Благодаря тому, что данный прибор совмещает свойства CO₂-инкубатора и микроскопа, что полностью исключает контаминирующее стрессовое влияние изменений условий окружающей среды во время экспозиции с тестируемым веществом, а также предоставляет возможность проводить фотодокументирование клеточной культуры в фазовом контрасте или с флуоресцентным окрашиванием в автоматическом режиме, BioStation CT делает возможным непрерывное, не ограниченное по срокам наблюдение с последующим анализом особенностей поведения клеток на всем протяжении эксперимента, что принципиально отличается от систем, допускающих только фиксирование конечного результата долгосрочного воздействия активным веществом.

Ключевые слова: цитотоксичность, CO₂-инкубатор BioStation CT, клетки карциномы Эрлиха

Для цитирования: Трухан И.С., Дремина Н.Н., Лозовская Е.А., Шурыгина И.А. Оценка потенциальной цитотоксичности в рамках прижизненного наблюдения на BioStation CT. Acta biomedica scientifica, 2018, 3 (6), 48-53, DOI 10.29413/ABS.2018-3.6.6.

Assessment of Potential Cytotoxicity During Vital Observation at the BioStation CT

Trukhan I.S., Dremina N.N., Lozovskaya E.A., Shurygina I.A.

Irkutsk Scientific Centre of Surgery and Traumatology
(ul. Bortsov Revolyutsii 1, Irkutsk 664003, Russian Federation)

Abstract

In recent decades, the methods based on the cell technologies have become more relevant for medical and pharmaceutical research. In this paper, we considered the BioStation CT using for continuous in vivo observation of Ehrlich ascitic carcinoma cell culture under the influence of two active substances in different concentrations (from 1.25 to 20 mg/l). As a result of the carcinoma cells condition monitoring for 4.5 days it was shown that substance No 2 does not affect the cell viability while substance No 1 causes the carcinoma cell death, and this active substance effect is dose-dependent. Photodocumentation at two-hour intervals allowed us to research differences in the rate of cell destruction (intensive disintegration in the first day with further stabilization of the living cells number or gradual cell death throughout the experiment), as well as differences in the time of 50 % mortality reaching. Thus in the study it was demonstrated that due to the fact that the BioStation CT combines the properties of a CO₂-incubator and a microscope this device is promising for toxicological studies and significantly expands the detection possibilities of processes occurring with living cells for a sufficiently long time period making possible further analysis of the cell behavior characteristics throughout the experiment, and that is fundamentally different from the systems allowing only the final result fixation of long-term active substance exposure.

Key words: cytotoxicity, CO₂-incubator BioStation CT, Ehrlich carcinoma cells

For citation: Trukhan I.S., Dremina N.N., Lozovskaya E.A., Shurygina I.A. Assessment of potential cytotoxicity during vital observation at the BioStation CT. Acta biomedica scientifica, 2018, 3 (6), 48-53, DOI 10.29413/ABS.2018-3.6.6.

ВВЕДЕНИЕ

Исторически традиционным подходом в медицине и фармакологии является использование мелких быстро размножающихся животных в качестве модельных объектов. Особенно широко они применяются при токсикологических исследованиях для выявления потенциально опасных для здоровья человека соединений, а также для изучения характера воздействия исследуемого вещества на живой организм, оценки возможных рисков и установления критической дозы. Однако в последние десятилетия более актуальными становятся исследования, основанные на клеточных технологиях [1, 2, 3, 4]. Работа с клеточной культурой, по сравнению с использованием животных, имеет ряд очевидных преимуществ, таких как отсутствие затрат на содержание животных, уменьшение длительности эксперимента, непосредственное наблюдение цитологического воздействия, возможность исследования механизмов, опосредующих токсический эффект тестируемого вещества, на клеточном уровне [5, 6, 7], а также возможность использования культур клеток человека, что позволяет нивелировать межвидовые различия на молекулярно-генетическом и рецепторно-сигнальном уровнях [5, 6, 8].

Сейчас успехи в сфере исследования клеточных культур привели к разработке инкубаторов для поддержания жизнеспособности клеток, способных обеспечивать не только температуру, близкую к температуре тела (37 °C), но и высокую влажность (80–90 %) и содержание CO₂ (5 %) [2, 4]. Одной из последних разработок компании Nikon является BioStation CT, совмещающая в себе свойства CO₂-инкубатора и микроскопа. Данная станция делает возможным наблюдение за инкубируемой культурой клеток в автоматическом режиме без необходимости извлекать данную культуру из надлежащей среды и подвергать клетки дополнительному стрессу. В связи с этим данный инкубатор может быть применён для исследования цитотоксичности природных и вновь синтезированных соединений по отношению к клеточным культурам различного происхождения в течение всего времени воздействия вещества на клетки.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценить возможность использования BioStation CT для определения потенциальной цитотоксичности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на первичной культуре клеток асцитной карциномы Эрлиха, полученных из перепрививаемой культуры, поддерживаемой в белых лабораторных мышах. Культура данного перепрививаемого штамма приобретена в питомнике ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» (посёлок Кольцово, Новосибирская область, Россия), ветеринарный сертификат 254 № 0336050 от 28.07.2010 г. Забор асцитной жидкости осуществлялся на log-фазе размножения штамма асцитной карциномы Эрлиха.

Полученную клеточную суспензию разводили в 500 раз питательной средой DMEM, дополненной 50 мкг/мл антибиотика гентамицина, после чего культивировали в течение 7 суток в 24-луночных планшетах при температуре 37 °C, влажности 80 %, содержании CO₂ 5 %, используя CO₂-инкубатор BioStation CT (Nikon). Через 7 дней культивирования опухолевых клеток в соответствующие лунки были добавлены тестируемые вещества в разных концентрациях (потенциально токсичное вещество № 1, потенциальное индифферентное вещество № 2); в контрольные лунки вносили равное количество среды DMEM. Цитотоксичность исследуемых веществ определяли морфологически по нарушению целостности клеточной мембраны и выходу клеточного содержимого в среду, используя программный продукт Nis-Elements AR 4.1. Степень токсичности разных концентраций тестируемых веществ для карциномных клеток сравнивали, используя показатель ЛД50. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью лицензионного пакета прикладных программ Statistica 6.1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Одной из основных особенностей CO₂-инкубатора BioStation CT, используемого в данной работе, является возможность проводить наблюдения за культивируемыми клетками в условиях температуры, влажности и содержания углекислого газа, необходимых для поддержания жизнеспособности клеток, что полностью исключает контаминирующее стрессовое влияние изменений условий окружающей среды во время экспозиции с тестируемым веществом. Другая не менее важная особенность данного CO₂-инкубатора определяется возможностью проводить фотодокументирование клеточной культуры в фазовом контрасте или с флуоресцентным окрашиванием в автоматическом режиме, благодаря чему наблюдение можно производить непрерывно в течение нескольких суток с временными интервалами, устанавливаемыми самим исследователем. В данном случае фотодокументирование состояния клеток асцитной карциномы Эрлиха проводилось каждые 2 часа в пяти точках каждой лунки в течение 102 часов.

Выбранный временной интервал позволил проследить скорость гибели клеток, а также оценить характер изменения их численности при воздействии разных концентраций (от 1,25 до 20 мг/л) тестируемых соединений (рис. 1, 2).

В результате проведённого исследования выявлено, что инкубирование с разными концентрациями вещества № 2 (1,25 мг/л; 2,5 мг/л; 5 мг/л; 10 мг/л; 20 мг/л) не оказало никакого заметного влияния на клетки карциномы Эрлиха (рис. 3, 4), что полностью соответствовало контрольной группе образцов. За время воздействия веществом № 2 количество документируемых клеток не изменялось, их целостность не нарушалась, не было обнаружено заметных повреждений (рис. 3, 4).

Рис. 1. Цитотоксическое действие разных концентраций вещества № 1 (20 мг/л; 10 мг/л) на культивируемые клетки карциномы Эрлиха. Приведены медианы, 1-е и 3-и квартили серии повторов. Данные представлены в процентном отношении к изначальному количеству живых клеток.

Fig. 1. Cytotoxic effect of substance N 1 in different concentrations (20 mg/l, 10 mg/l) on cultivated Ehrlich carcinoma cells: median values, first and third quartiles; % to the initial number of living cells.

Рис. 2. Цитотоксическое действие разных концентраций вещества № 1 (5 мг/л; 2,5 мг/л; 1,25 мг/л) на культивируемые клетки карциномы Эрлиха. Приведены медианы, 1-е и 3-и квартили серии повторов. Данные представлены в процентном отношении к изначальному количеству живых клеток.

Fig. 2. Cytotoxic effect of substance N 1 in different concentrations (5 mg/l, 2.5 mg/l, 1.25 mg/l) on cultivated Ehrlich carcinoma cells: median values, first and third quartiles; % to the initial number of living cells.

Рис. 3. Культура карциномных клеток через 2 часа после воздействия веществом № 2.

Fig. 3. Carcinoma cells in 2 hours after incubation with substance N 2.

Рис. 4. Культура карциномных клеток через 102 часа после инкубации с веществом № 2.

Fig. 4. Carcinoma cells in 102 hours after incubation with substance N 2.

Однако в лунках, в которых клетки инкубировались с веществом № 1, наблюдались существенные изменения, которые носили дозозависимый характер. Карциномные клетки, подвергшиеся воздействию вещества № 1 в концентрации 20 мг/л, в первые сутки активно разрушались, утрачивая целостность клеточной мембраны с последующим выходом цитоплазматического содержимого в среду. Уже через 6 часов инкубации количество погибших клеток достигало ЛД50. Кроме того, в среде прогрессивно увеличивалось количество клеточного дебриса, что в свою очередь также указывало на активный распад карциномных клеток. В последующие сутки скорость гибели снижалась, но, тем не менее, к концу эксперимента наблюдались лишь единичные клетки, не утратившие структурную целостность (рис. 5, 6, 7, 8).

При анализе фотодокументации было отмечено, что гибель клеток карциномы Эрлиха в процессе инкубации с веществом № 1 в концентрациях 20 мг/л и 10 мг/л обладала следующими особенностями: клетки активно гибли в 1-е сутки воздействия активным веществом, тогда как на 2-е сутки и далее снижение их числа носило постепенный характер (рис. 1, 5, 6, 7, 8). В то же время при воздействии вещества № 1 в концентрациях 5 мг/л и 2,5 мг/л клеточная гибель была более выражена в первые часы и достигала 50 % раньше, чем при воздействии более высоких концентраций. При этом к концу 1-х суток количество клеток достигало стационарного состояния или лишь незначительно снижалось на 3-и сутки (рис. 2, 9, 10).

Рис. 5. Культура карциномных клеток через 2 часа после воздействия 20 мг/л вещества № 1.

Fig. 5. Carcinoma cells in 2 hours after incubation with 20 mg/l substance N 1.

Рис. 7. Культура карциномных клеток через 78 часов воздействия 20 мг/л вещества № 1.

Fig. 7. Carcinoma cells in 78 hours after incubation with 20 mg/l substance N 1.

Рис. 6. Культура карциномных клеток через 28 часов воздействия 20 мг/л вещества № 1.

Fig. 6. Carcinoma cells in 28 hours after incubation with 20 mg/l substance N 1.

Рис. 8. Культура карциномных клеток через 102 часа воздействия 20 мг/л вещества № 1.

Fig. 8. Carcinoma cells in 102 hours after incubation with 20 mg/l substance N 1.

Рис. 9. Культура карциномных клеток через 2 часа воздействия 5 мг/л вещества № 1.

Fig. 9. Carcinoma cells in 2 hours after incubation with 5 mg/l substance N 1.

Рис. 11. Культура карциномных клеток через 2 часа воздействия 1,25 мг/л вещества № 1.

Fig. 11. Carcinoma cells in 2 hours after incubation with 1.25 mg/l substance N 1.

Рис. 10. Культура карциномных клеток через 102 часа воздействия 5 мг/л вещества № 1.

Fig. 10. Carcinoma cells in 102 hours after incubation with 5 mg/l substance N 1.

Рис. 12. Культура карциномных клеток через 102 часа воздействия 1,25 мг/л вещества № 1.

Fig. 12. Carcinoma cells in 102 hours after incubation with 1.25 mg/l substance.

При инкубации клеток с низкой концентрацией вещества № 1 (1,25 мг/л) воздействие тестируемого вещества было минимальным: гибель карциномных клеток отмечалась только в 1-е сутки, после чего их количество стабилизировалось и до окончания эксперимента не достигало 50%-й смертности (рис. 2, 11, 12).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном исследовании была рассмотрена возможность применения CO₂-инкубатора BioStation CT для непрерывного прижизненного наблюдения за культурой клеток асцитной карциномы Эрлиха во время инкубации с двумя тестируемыми соединениями. Было показано, что данное оборудование является перспективным для токсикологических исследований и значительно расширяет возможности детектирования процессов, происходящих

с живыми клетками за достаточно протяжённый период времени. Также используемый инкубатор позволяет отмечать особенности поведения клеток (изменения скорости гибели, время достижения ЛД₅₀) на всём протяжении эксперимента, в отличие от систем, допускающих только фиксирование конечного результата долгосрочного воздействия активным веществом.

Исследование проведено с применением оборудования ЦКП «Диагностические изображения в хирургии».

ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Das V, Bruzzese F, Konecny P, Iannell F, Budillon A, Hajduch M. (2015). Pathophysiologically relevant in vitro tumor models for drug screening. *Drug Discov Today*, 20 (7), 848-855. doi: 10.1016/j.drudis.2015.04.004
2. Eisenbrand G, Pool-Zobel B, Baker V, Balls M, Blaauwboer BJ, Boobis A, Carere A, Kevekordes S, Lhuguenot J-C, Pieters R, Kleiner J. (2002). Methods of in vitro toxicology. *Food Chem Toxicol*, (40), 193-236.
3. Ekwall B, Silano V, Paganuzzi-Stammati A, Zucco F. (1990). Toxicity tests with mammalian cell cultures. *Short-term Toxicity Tests for Non-genotoxic Effects*, 75-98.

4. Eskes C, Boström A-C, Bowe G, Coecke S, Hartung T, Hendriks G, Pamies D, Piton A, Rovida C. (2017). Good cell culture practices & in vitro toxicology. *Toxicol in Vitro*, (45), 272-277. doi: 10.1016/j.tiv.2017.04.022

5. Jennings P. (2015). The future of in vitro toxicology. *Toxicol in Vitro*, 29 (6), 1217-1221. doi: 10.1016/j.tiv.2014.08.011

6. Krewski D, Acosta Jr D, Andersen M, Anderson H, Bailar III JC, Boekelheide K, Brent R, Charnley G, Cheung VG, Green Jr S, Kelsey KT, Kerkvliet NI, Li AA, McCray L, Meyer O, Patterson RD, Pennie W, Scala RA, Solomon GM, Stephens M, Yager J, Zeise L. (2010). Toxicity testing in the 21st century: a vision and a strategy. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, (13), 51-138. doi: 10.1080/10937404.2010.483176

7. Roggen EL. (2011). In vitro toxicity testing in the twenty-first century. *Front Pharmacol* (2), 1-3. doi: 10.3389/fphar.2011.00003

8. Shurygina IA, Shurygin MG, Dmitrieva LA, Fadeeva TV, Ganenko TV, Tantsyrev AP, Sapozhnikov AN, Sukhov BG, Trofimov BA. (2015). Bacterio- and lymphocytotoxicity of silver nanocomposite with sulfated arabinogalactan. *Russian Chemical Bulletin*, 64 (7), 1629-1632.

Сведения об авторах

Трухан Ирина Сергеевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий и регенеративной медицины научно-лабораторного отдела, ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии» (664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1; тел. (3952) 53-98-34; e-mail: PREDEL4@yandex.ru) ● <http://orcid.org/0000-0002-0270-404X>

Дремина Наталья Николаевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий и регенеративной медицины научно-лабораторного отдела, ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии» (664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1; тел. (3952) 53-98-34; e-mail: drema76@mail.ru) ● <http://orcid.org/0000-0002-2540-4525>

Лозовская Евгения Александровна – кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник научного отдела экспериментальной хирургии с виварием, ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии» (664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1; e-mail: molodegny31@mail.ru) ● <http://orcid.org/0000-0003-3851-128X>

Шурыгина Ирина Александровна – доктор медицинских наук, профессор РАН, заместитель директора по научной работе, ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии» (664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1; тел. (3952) 29-03-69; e-mail: irinashurygina@gmail.com) ● <http://orcid.org/0000-0003-3980-050X>

Information about the authors

Irina S. Trukhan – Cand. Sc. (Biol.), Senior Research Officer at the Laboratory of Cell Technology and Regenerative Medicine of Research Laboratory Department, Irkutsk Scientific Centre of Surgery and Traumatology (664003, Irkutsk, ul. Bortsov Revolyutsii, 1; tel. (3952) 53-98-34; e-mail: PREDEL4@yandex.ru) ● <http://orcid.org/0000-0002-0270-404X>

Nataliya N. Dremina – Cand. Sc. (Biol.), Senior Research Officer at the Laboratory of Cell Technology and Regenerative Medicine of Research Laboratory Department, Irkutsk Scientific Centre of Surgery and Traumatology (664003, Irkutsk, ul. Bortsov Revolyutsii, 1; tel. (3952) 53-98-34; e-mail: drema76@mail.ru) ● <http://orcid.org/0000-0002-2540-4525>

Evgeniya A. Lozovskaya – Cand. Sc. (Vet.), Senior Research Officer at the Scientific Department of Experimental Surgery with Vivarium, Irkutsk Scientific Centre of Surgery and Traumatology (664003, Irkutsk, ul. Bortsov Revolyutsii, 1) ● <http://orcid.org/0000-0003-3851-128X>

Irina A. Shurygina – Dr. Sc. (Med.), Professor of the Russian Academy of Sciences, Deputy Director for Science, Irkutsk Scientific Centre of Surgery and Traumatology, (664003, Irkutsk, ul. Bortsov Revolyutsii, 1; tel. (3952) 29-03-69; e-mail: irinashurygina@gmail.com) ● <http://orcid.org/0000-0003-3980-050X>