

СЕМЕНОВА Е. В., МИНАЕВА О. В., ЗУЛЬФУГАРОВ П. К.,

АЛИМОВА Д. И., ВАТИНА А. Б.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДА
С ПОМОЩЬЮ МТТ-ТЕСТА НА КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК L929**

Аннотация. Целью исследования было изучение цитотоксичности диметилсульфоксида на культуре клеток фибробластов мыши L929. Цитотоксичность оценивали при помощи МТТ-теста по стандартной методике. Клетки инкубировали 24 часа, затем добавляли диметилсульфоксид в концентрациях от 1 до 0,0625% (в 0,9% физиологическом растворе), титруя концентрацию 1 : 2. В качестве пассивного контроля использовали растворитель (0,9% физиологический раствор), добавлявшийся в лунки в том же объеме. Время экспозиции с диметилсульфоксидом составило 48 часов. Все эксперименты были выполнены в трех повторностях. Было установлено, что диметилсульфоксид оказывал статистически значимое цитотоксическое действие на мышинные фибробласты L929 при инкубации в течение 48 часов в концентрациях 1 и 0,5%. Данный факт необходимо учитывать при добавлении диметилсульфоксида в качестве растворителя для неполярных липофильных веществ, эффект которых будет изучаться на данной линии клеток.

Ключевые слова: диметилсульфоксид, цитотоксичность, колориметрический тест для оценки метаболической активности клеток, фибробласты мыши.

SEMENOVA E. V., MINAEVA O. V., ZULFUGAROV P. K., ALIMOVA D. I., VATINA A. B.

**A STUDY OF DIMETHYL SULFOXYDE CYTOTOXICITY
BY MTT-TEST ON L929 CELL CULTURE**

Abstract. The study objective was to investigate the cytotoxicity of dimethyl sulfoxide on the cell culture of the murine fibroblasts L929. The cytotoxicity was studied by the standard procedure of MTT-test. The cells were incubated during 24 hours. Then dimethyl sulfoxide in concentrations from 1 to 0,0625% (by titration 1 : 2) was added. The standard medium without dimethyl sulfoxide was added in equivalent amount as passive control. The exposition time of the studied substances was 48 hours. All experiments were repeated three times. It was found that dimethyl sulfoxide has cytotoxic activity on the cell culture of the murine fibroblasts L929 after 48 hours of incubation at 1 and 0,5% concentration. This fact should be taken into consideration if dimethyl sulfoxide is used as solvent for nonpolar lipophilic substances testing on the cell culture of the murine fibroblasts.

Keywords: dimethyl sulfoxide, cytotoxicity, colorimetric test to assess metabolic activity of cells, murine fibroblasts.

Актуальность. Диметилсульфоксид (ДМСО) является малотоксичным веществом, его ЛД50 для различных видов животных при пероральном введении находится в пределах от 2 до 12 г диметилсульфоксида на 1 кг живого веса. ДМСО относится к широко используемым растворителям для веществ, плохо растворимых в воде [1–3]. Его нередко добавляют в водные растворы в небольшой концентрации для увеличения растворимости тестируемых соединений [4; 5]. Однако сам диметилсульфоксид не является инертным в отношении биологических объектов веществом и может оказывать влияние на получаемые результаты.

По данным ряда экспериментальных исследований [1–3], было показано, что ДМСО обладает противовоспалительным и антимикробным действием.

По результатам клинических исследований [4–6] ДМСО оказался эффективен в качестве болеутоляющего средства при острых травматических заболеваниях, особенно мускульно-скелетной системы, при острой невралгии, определенных урологических нарушениях. ДМСО применяется в качестве местного анальгетика для ослабления или устранения болевых ощущений, в частности при радикулитах. ДМСО высоко эффективен в качестве криопротектора и применяется для консервации крови и тканей. Имеются работы, демонстрирующие радиопротекторные свойства диметилсульфоксида.

В ряде работ [3–6] на различных клеточных культурах (клетки HeLa, гемопоэтические опухолевые клеточные линии) было установлено цитотоксическое действие диметилсульфоксида в определенных диапазонах концентраций. При этом цитотоксический эффект ДМСО существенно отличался в зависимости от типа клеточной линии, что обуславливает необходимость предварительного изучения влияния предполагаемого рабочего диапазона концентраций ДМСО на целевую клеточную линию в случае его использования в качестве вещества, повышающего растворимость тестируемых соединений.

Цель работы: изучение цитотоксичности диметилсульфоксида по результатам колориметрического теста для оценки метаболической активности клеток (МТТ-теста).

Материалы и методы. Цитотоксичность диметилсульфоксида исследовалась с помощью МТТ-теста на культуре клеток фибробластов мыши L929 (получены из Коллекции культур тканей НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского) в рамках подготовки исследования цитотоксичности новых синтетических аналогов ресвератрола на той же культуре клеток, где планируется применение диметилсульфоксида как растворителя с предполагаемым диапазоном рабочих концентраций от 1 до 0,1%.

Фибробласты мыши культивировались на среде DMEM с добавлением в качестве стимулятора роста 10% эмбриональной телячьей сыворотки в общепринятых условиях: атмосфера 5% CO₂, при температуре 37 °C и влажности 5% в инкубаторе Sanyo (Япония).

Для эксперимента в экспоненциальную фазу роста клетки были рассеяны в 96-луночный планшет (по 2×10^3 кл/лунка) в объеме 100 мкл среды DMEM с 10 % эмбриональной телячьей сыворотки. Клетки инкубировали 24 часа, затем добавляли диметилсульфоксид в концентрациях от 1 до 0,0625 %, разведенный в 0,9 % физиологическом растворе, титруя концентрацию 1 : 2. В качестве пассивного контроля использовали растворитель (0,9 % физиологический раствор), добавлявшийся в лунки в том же объеме. Время экспозиции с диметилсульфоксидом составило 48 часов.

МТТ-тест проводился по методике, описанной ранее [7]. После указанного выше интервала времени инкубации среду заменяли на свежую и добавляли микродозатором 30 мкл раствора МТТ (концентрация 5 мг/мл). После чего клетки инкубировали в течение 3 ч в стандартных условиях инкубатора, затем среду аспирировали и в лунки добавляли 150 мкл 100 % ДМСО (который использовали в данном случае для лизирования клеток). Далее планшеты помещали в шейкер на 20 минут для полного растворения образовавшегося формазана. Для оценки оптической плотности (ОП) использовали микропланшетный ИФА-ридер (ЭФОС 9305, Россия) при длине волны 492 нм против референсной 620 нм. Клеточную жизнеспособность определяли как соотношение ОП образца к ОП контроля, выраженное в процентах.

Все эксперименты повторяли 3 раза. Статистический анализ данных проводили с помощью одностороннего дисперсионного анализа в программе Statistica 10.0. Различия признавали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. По данным МТТ теста, представленным на рисунке 1 и в таблице 1, было выявлено, что диметилсульфоксид в концентрациях 1 и 0,5% оказывал статистически значимое цитотоксическое действие на мышинные фибробласты L929 при инкубации в течение 48 часов.

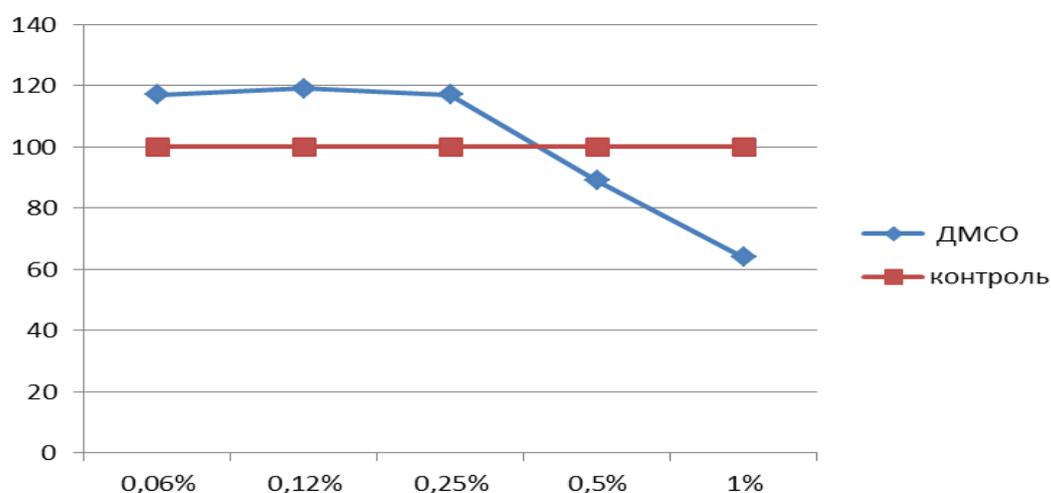


Рис. 1. Выживаемость фибробластов L929 на фоне воздействия диметилсульфоксида по данным МТТ-теста.

Выживаемость фибробластов мыши L929 на фоне воздействия диметилсульфоксида в течение 48 часов по данным МТТ-теста (результаты колориметрической оценки)

	Контроль	ДМСО				
		1 %	0,5 %	0,25 %	0,125 %	0,0625 %
Выживаемость фибробластов мыши L929	0,62±0,015	0,40±0,01 *	0,55±0,02 *	0,73±0,01	0,74±0,03	0,73±0,01

Примечание: * – статистически значимые различия при $p < 0,05$

При этом жизнеспособность клеток в диапазоне концентраций диметилсульфоксида от 0,25 до 0,0625% была несколько выше, чем в контроле, однако различия не достигали уровня статистической значимости.

При световой микроскопии планшетов с фибробластами мыши линии, проведенной до постановки МТТ-теста, было выявлено, что при добавлении диметилсульфоксида в концентрации менее 0,5%, также как и в контроле, визуально заметных признаков отклонений от нормы не наблюдается. На фоне добавления диметилсульфоксида в концентрациях 0,5 и 1% нарушается целостность «клеточного ковра», появляются фибробласты с признаками дистрофии, зернистостью цитоплазмы, а также отдельные фрагментированные фибробласты, определяются зоны деструкции и лизиса клеток.

Заключение. Было установлено, что диметилсульфоксид оказывает статистически значимое цитотоксическое действие на мышинные фибробласты L929 при инкубации в течение 48 часов в концентрациях 1 и 0,5%. Данный факт необходимо учитывать при добавлении диметилсульфоксида в качестве растворителя для неполярных липофильных веществ, эффект которых будет изучаться на данной линии клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ben Trivedi A., Kitabatake N. Toxicity of dimethyl sulfoxide as a solvent in bioassay system with HeLa cells evaluated colorimetrically with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide // *Agricultural and biological chemistry*. – 1990. – Vol. 54(11). – pp. 2961-2966.
2. Svalgaard J. D., Haastrup E. K., Reckzeh K., Holst B., Glovinski P. V., Kørlov J. S., Hansen M. B., Moench K. T., Clausen C., Fischer-Nielsen A. Low-molecular-weight carbohydrate Pentaisomaltose may replace dimethyl sulfoxide as a safer cryoprotectant

- for cryopreservation of peripheral blood stem cells // *Transfusion*. – 2016. – Vol. 56(5). – pp. 1088–1095.
3. Koiri R. K., Trigun S. K. Dimethyl sulfoxide activates tumor necrosis factor α -p53 mediated apoptosis and down regulates D-fructose- 6-phosphate-2-kinase and lactate dehydrogenase-5 in Dalton's lymphoma in vivo // *Leukemia Research*. – 2011. – Vol. 35. – pp. 950–956.
 4. Fatemeh H., Shaghayegh T. Assessment of cytotoxicity of dimethyl sulfoxide in human hematopoietic tumor cell lines // *Iranian Journal of Blood and Cancer*. – 2017. – Vol. 9(2). – pp. 48-53.
 5. Chao S. C., Chen Y. J., Huang K. H. Induction of sirtuin-1 signaling by resveratrol induces human chondrosarcoma cell apoptosis and exhibits antitumor activity // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7(1). – P. 3180.
 6. Сипров А. В., Соловьева М. А. Морфофункциональное состояние эритроцитов крыс с карциномой WALKER-256 при сочетанном применении доцетаксела и ксимедона // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2017. – Т. 164. – № 7. – С. 56-60.
 7. Бродовская Е. П., Минаева О. В., Коляденкова О. С. Сравнительное исследование цитотоксичности некоторых наноматериалов на культуре клеток фибробластов L929 // *Материалы XX научно-практической конференции молодых ученых, аспирантов и студентов Национального исследовательского Мордовского государственного университета им. Н. П. Огарёва: в 3-х частях: Ч. 2.* – 2016. – С. 37–39.