

ВЛИЯНИЕ ОЗОНА И ДОКСОРУБИЦИНА НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И МОРФОЛОГИЮ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ

DOI: 10.17691/stm2016.8.2.12

УДК 612.014.464:616.36-006.6

Поступила 9.03.2016 г.

А.В. Алясова, д.м.н., профессор кафедры онкологии¹;М.В. Ведунова, д.б.н., и.о. директора института биологии и биомедицины²;Т.А. Мищенко, к.б.н., младший научный сотрудник отдела молекулярно-клеточных технологий ЦНИЛ¹;И.Г. Терентьев, д.м.н., профессор, зав. кафедрой онкологии¹;С.Н. Цыбусов, д.м.н., профессор, зав. кафедрой оперативной хирургии и топографической анатомии¹;К.Н. Конторщикова, д.б.н., профессор, зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики¹¹Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород, 603005, пл. Минина и Пожарского, 10/1;²Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Н. Новгород, 603950, пр. Гагарина, 23

Цель исследования — изучить влияние изолированного и сочетанного действия озono-кислородной смеси и химиопрепарата доксорубицина на жизнеспособность и морфологию нормальных и злокачественных клеток печени человека.

Материалы и методы. Исследования проводились на культуре нормальных (Chang liver) и злокачественных (SK-HEP-1) клеток печени человека. Химиопрепарат доксорубицин и озono-кислородную газовую смесь вводили в культуральную среду для выращивания клеток. Проверку клеток на жизнеспособность проводили по восстановлению солей тетразолия МТТ. Морфологические исследования выполняли через 48 ч после замены культуральной среды с помощью инвертированного микроскопа DMIL HC (Германия).

Результаты. Наибольшей цитотоксичностью в отношении как нормальных, так и злокачественных клеток печени человека обладает доксорубицин. Озон как изолированно, так и в комбинации с доксорубицином также оказывает выраженный цитостатический эффект на жизнеспособность клеток и приводит к необратимым последствиям для структуры клеточных элементов. Полученные результаты можно использовать для подбора доз озона и способов его введения при различных локализациях опухолей.

Ключевые слова: клетки печени; доксорубицин; озон.

Как цитировать: Alyasova A.V., Vedunova M.V., Mishchenko T.A., Terentyev I.G., Tsybusov S.N., Kontorshchikova K.N. Effect of ozone and doxorubicin on the viability and morphology of malignant hepatic cells. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2016; 8(2): 84–89, <http://dx.doi.org/10.17691/stm2016.8.2.12>.

English

Effect of Ozone and Doxorubicin on the Viability and Morphology of Malignant Hepatic Cells

A.V. Alyasova, MD, DSc, Professor, Department of Oncology¹;M.V. Vedunova, DSc, Acting Director, Institute of Biology and Biomedicine²;T.A. Mishchenko, PhD, Junior Researcher, Department of Molecular and Cellular Technologies, Central Research Laboratory¹;I.G. Terentyev, MD, DSc, Professor, Head of Oncology Department¹;S.N. Tsybusov, MD, DSc, Professor, Head of the Department of Operative Surgery and Topographic Anatomy¹;K.N. Kontorshchikova, DSc, Professor, Head of the Department of Clinical Laboratory Diagnostics¹¹Nizhny Novgorod State Medical Academy, 10/1 Minin and Pozharsky Square, Nizhny Novgorod, 603005, Russian Federation;²Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, 23 Prospect Gagarina, Nizhny Novgorod, 603950, Russian Federation

The aim of the investigation was to study the effect of isolated and combined action of ozone-oxygen mixture and doxorubicin on the viability and morphology of normal and malignant human hepatic cells.

Для контактов: Конторщикова Клавдия Николаевна, e-mail: kontkn@mail.ru

Material and Methods. The culture of normal (Chang liver) and malignant (SK-HEP-1) human liver cells were used in the study. Doxorubicin and ozone-oxygen gas mixture were introduced to the culture medium for cell growth. Viability was tested by reduction of MTT tetrazole salts. Morphological investigations were carried out 48 h after the replacement of the cultural medium using DMIL HC inverted microscope (Germany).

Results. Doxorubicin possesses the highest cytotoxicity relative to both normal and malignant human hepatic cells. Ozone alone and in combination with doxorubicin also exerts a marked cytotoxic effect on the viability of the cells and results in irreversible consequences for the structure of the cell elements. The results obtained can be used for selection of ozone doses and ways of ozone introduction in various tumor localizations.

Key words: hepatic cells; doxorubicin; ozone.

В последние годы в медицине наряду с хирургическим и лекарственным лечением используются немедикаментозные методы. Некоторые из них применяются в онкологии для поддержания собственных компенсаторных функций организма, в первую очередь нейроэндокринной и иммунной систем. Одним из таких методов является озонотерапия. В клинической практике доказана эффективность очень низких доз озона, позволяющих корректировать состояние организма и поддерживать оптимальное течение адаптационных процессов.

Предпосылками для использования озона в онкологии можно считать два открытия немецких ученых: О.Н. Warburg (1966), утверждавшего, что ключевой предпосылкой для развития опухоли является недостаток кислорода на клеточном уровне, и J. Varro (1974), выявившего непереносимость опухолевыми клетками пероксидов. В 1980 г. F. Sweet с соавт. представили доказательства ингибирующего действия озона по отношению к опухолевым клеткам в условиях *in vitro*, обнаружив слабую способность опухолевых клеток компенсировать кислородный «взрыв», вызванный озоном, по сравнению с нормальными клетками и установив 90% подавление роста малигнизированных клеток [1].

В 1982 г. Н.Н. Wolf выявил дозозависимый антипролиферативный эффект озона [2]. Позднее Н. Karlic с соавт. подтвердили селективное подавление озоном роста клеток карциномы яичников и эндометрия [3]. K.S. Zanker, P. Krocsek обнаружили повышение под влиянием озона чувствительности резистентных линий опухолевых клеток к цитостатическим препаратам [4].

В работе M. Arnan, L.E. DeVries [5] продемонстрировано увеличение выживаемости мышей с перевитой карциномой, получивших инъекции озono-кислородной смеси. Y. Rodrigues с соавт. [6] показали антимиетастатический эффект озона. В наших экспериментальных исследованиях, выполненных на лабораторных животных с перевитой опухолью молочной железы [7], показано, что действие озона на патоморфоз злокачественных клеток сопоставимо с действием известного химиопрепарата доксорубина. Доксорубин является антибиотиком антрациклинового ряда. В последнее время доксорубин используется в экспериментах на культуре клеток для разработки методов снятия резистентности [8, 9]. Нами продемонстрировано

выраженное повреждающее действие на опухоль сочетания озона и доксорубина. Кроме того, были определены эффективные концентрации озона и доксорубина. Для уточнения механизмов действия озона и доксорубина необходимым явился переход от экспериментов на целомом организме животного к культуре злокачественных клеток.

Цель исследования — изучение изолированного и сочетанного влияния доксорубина и озона на жизнеспособность и морфологию нормальных и злокачественных клеток печени человека.

Материалы и методы. В работе использовались два вида клеток:

1) культивированные клетки нормальной печени человека Chang liver; культивирование осуществлялось в среде «Игла MEM» с солями «Эрла» («ПанЭко», Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки («ПанЭко», Россия), оптимальная плотность — $(0,5-1,0) \cdot 10^5$ кл./мл;

2) клетки линии SK-HEP-1, (аденокарцинома печени человека, асцитная жидкость), морфология — эпителиоподобная, культивирование осуществлялось в среде «Игла MEM» с солями «Эрла» («ПанЭко», Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки («ПанЭко», Россия) и 1% заменимых аминокислот («ПанЭко», Россия), оптимальная плотность — $(2,0-4,0) \cdot 10^6$ кл./см².

Поддержание жизнеспособности культур проводилось в CO₂-инкубаторе, при 5% содержании CO₂. Эксперимент выполняли на 3–5-м пассаже. Клетки рассаживали на 48- или 6-луночные планшеты. При достижении 60% роста монослоя проводили замену культуральной среды на испытуемые.

Испытуемые среды готовили следующим образом: в 50 мл среды для выращивания клеток вводили: а) доксорубин в дозе 0,004 мг; б) 150 мл кислорода; в) 150 мл озono-кислородной смеси с концентрацией озона 25 мг/л; г) среду с кислородом + доксорубин 0,004 мг; д) среду с озono-кислородной смесью + доксорубин 0,004 мг. Кислород поступал из концентратора кислорода New Life Intensity (Buffalo, США). Озono-кислородная газовая смесь поступала со скоростью 1 л/мин в течение 5 мин из генератора озона («Квазар», Россия).

Через 48 ч культивирования испытуемая клеточная среда убиралась, клетки промывали полифосфатным

буфером (PBS) (pH=7,4) и заливали 250 мл смеси версена (0,02%) и трипсина (0,25%) в соотношении 3:1. Через 10 мин инкубации в CO₂-инкубаторе клетки пипетировали и добавляли в каждую лунку по 250 мл 8% формальдегида. После этого производили подсчет количества клеток на автоматическом анализаторе Septer (Millipore, Германия).

Проверку клеток на жизнеспособность выполняли по восстановлению солей тетразолия МТТ (Sigma, США) [10]. В основе метода лежит реакция восстановления желтой соли тетразолия — бромиды 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий) митохондриальными дегидрогеназами (оксидоредуктаза) живых клеток до голубых кристаллов формазаана [11]. Для этого клеточную среду убрали, клетки промывали раствором PBS (pH=7,4), в каждую ячейку вносили по 300 мкл раствора соли тетразолия МТТ (концентрация — 0,25 мг/мл в PBS, pH=7,4). Инкубировали в условиях CO₂-инкубатора в течение 30 мин. Далее раствор МТТ удаляли и клетки заливали для разрушения клеточных мембран изопропанолом. Через 10 мин измеряли оптическую плотность (A) при длине волны 570 и 620 нм. Здесь: 570 нм — максимум поглощения восстановленной формы МТТ, 620 нм — максимум поглощения триптофана, пропорциональный количеству белка в пробе, которая зависит от количества клеток.

Расчет жизнеспособности (E) проводили по формулам:

$$E = A_{570} - A_{620};$$

$$\% \text{ жизнеспособных клеток} = (E \text{ опыта} / E \text{ контроля}) \times 100\%.$$

При исследовании влияния окислителей и доксорубина на жизнеспособность клеток за контроль принимали изменение оптической плотности интактных культур.

Морфологические исследования проводили через 48 ч после замены клеток в лунках с помощью инвертированного микроскопа DMIL HC (Leica, Германия). Исследовали не менее пяти непересекающихся полей зрения с одной культуры.

Результаты. Изучение показателей жизнеспособности нормальных и злокачественных клеток печени (см. таблицу) показало, что она напрямую связана с активностью ферментов оксидоредуктаз. Снижение активности данных ферментов указывает на выраженную цитотоксичность доксорубина в отношении нормальных клеток печени (показатель жизнеспособности — 3,5%) и особенно злокачественных клеток печени (показатель жизнеспособности — 1,56%). Анализ действия окислителей выявил прямо противоположное действие на жизнеспособность клеток и озон-кислородной смеси. Обработка культуральной среды кислородом повышала активность как нормальных оксидоредуктаз (показатель жизнеспособности увеличился до 104%), так и злокачественных клеток (показатель жизнеспособности увеличился до 115%).

Показатели жизнеспособности нормальных и злокачественных клеток при воздействии окислителей и доксорубина, %

Фактор воздействия	Нормальные клетки печени	Злокачественные клетки печени
Кислород	103,2±9,7	112,0±17,3
Озono-кислородная смесь	4,5±2,7	15,7±5,0
Доксорубин	3,6±2,3	1,6±0,9
Доксорубин + кислород	4,6±1,4	16,5±3,2
Доксорубин + озон	7,9±3,2	2,6±1,8
Интактные клетки	100,0±6,4	100,0±7,9

Это свидетельствовало о том, что добавление кислорода не изменяло состав среды для клеточной культуры и не мешало ей расти. Напротив, дополнительный кислород по принципу обратной связи активировал оксидоредуктазы. Введение в культуральную среду озон-кислородной смеси вызывало образование продуктов взаимодействия озона с биоорганическими соединениями (озонидов). Эти продукты, по всей видимости, повреждали клеточные мембраны и подавляли активность оксидоредуктаз, что проявлялось снижением показателей жизнеспособности (4,54% — для нормальных клеток и 15,7% — для злокачественных клеток печени). Количественные различия жизнеспособности нормальных и злокачественных клеток можно объяснить более мощной антиоксидантной защитой злокачественных клеток.

Сочетанное использование доксорубина и кислорода показало, что применение двух агентов оказывает более выраженное действие на нормальные клетки, а не на злокачественные, имеющие более выраженную антиоксидантную систему защиты. Сочетание доксорубина и озона сопровождалось снижением жизнеспособности как нормальных клеток — до 7,9%, так и злокачественных — до 2,6%. Отличие этих показателей от тех, что получены при действии изолированного введения доксорубина и окислителей, связано, по всей видимости, с взаимодействием этих факторов между собой и компонентами клеток, в том числе и с антиоксидантами.

Исследование морфологической структуры клеток обеих выбранных линий (рис. 1, 2) показало, что кислород через 48 ч после замены культуральной среды не оказывает токсического действия на клеточные линии (рис. 1, в и 2, в). Структура клеток остается неизменной (рис. 1, а и 2, а). Структура клеток остается неизменной, конденсация хроматина, характерная для апоптоза, не наблюдается. В культуре хорошо видны активно делящиеся клетки, отдельные клеточные элементы, открепившиеся от подложки и свободно пилагирующие (плавающие) в клеточной среде (один из этапов развития монослоя). В культуре Chang liver обнаружено небольшое количество клеток с измененной морфологией, контуры клеток — неровные, хроматин изменен, однако количество изменений морфологи-

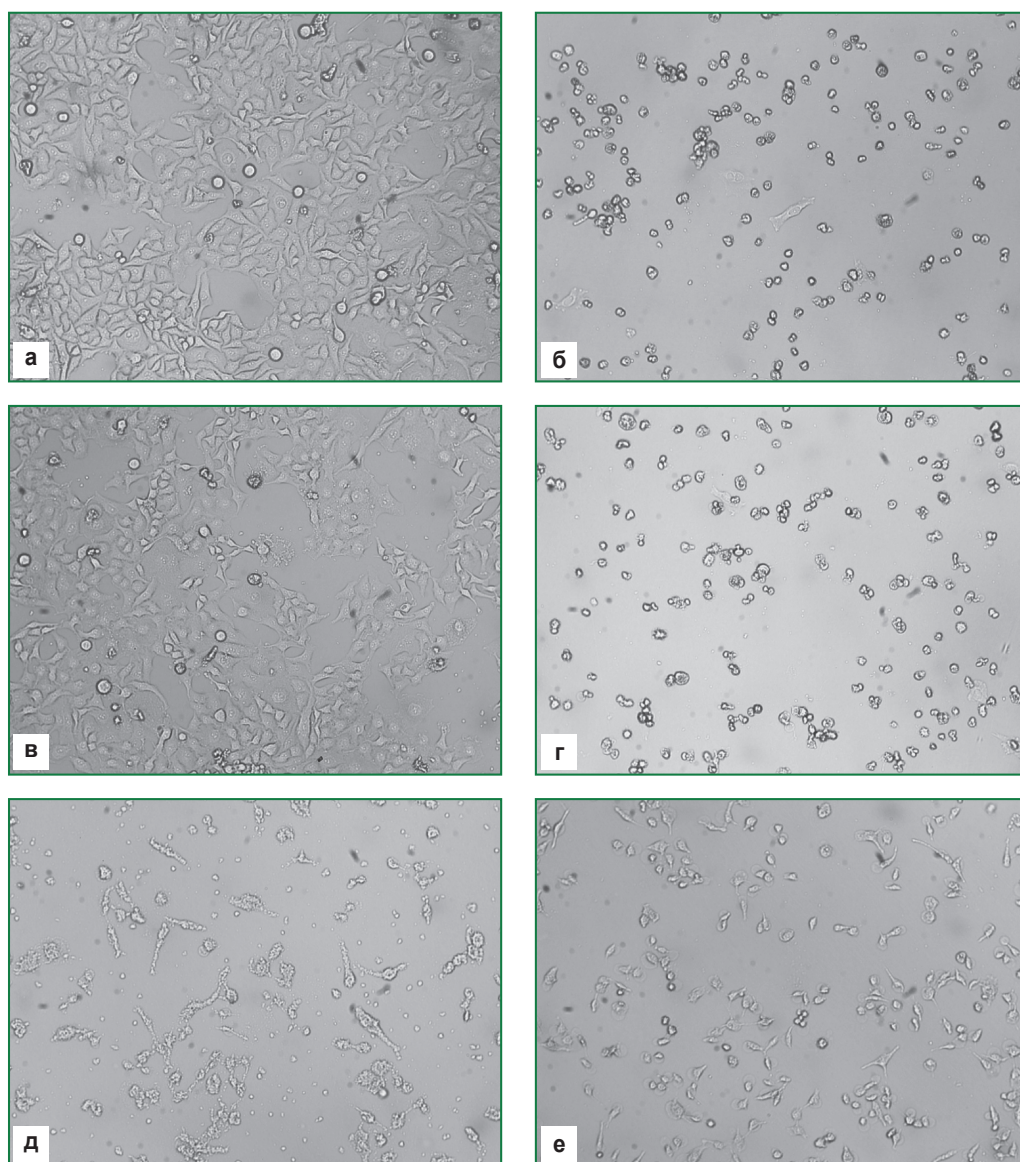


Рис. 1. Морфологическая структура клеток нормальной печени человека Chang liver после воздействия окислителей и доксорубина: а — интактные клетки; б — доксорубин в дозе 0,004 мг; в — кислород; г — кислород с доксорубином в дозе 0,004 мг; д — озон в концентрации 25 мг/л; е — озон в концентрации 25 мг/л с доксорубином в дозе 0,004 мг

ческой структуры не значимо. Несмотря на то, что увеличение концентрации кислорода для клеточных линий не является физиологичным и рассматривается как неблагоприятный фактор, в наших исследованиях не выявлено каких-либо изменений морфологической структуры и жизнеспособности клеток даже при максимальном насыщении культуральной среды.

Применение доксорубина в культуре клеток линии Chang liver (рис. 1, б) в выбранной концентрации приводит к существенным изменениям морфологии клеток. Наблюдается потеря характерной клеточной структуры, клетки теряют форму, открепляются от подложки, уменьшаются в размерах, выявляются выраженные изменения ядерного аппарата и всех орга-

нелл. Данные изменения характерны для погибших клеток. Добавление кислорода не влияет на эффекты, оказываемые доксорубином в концентрации 0,004 мг (рис. 1, г).

При изучении морфологии после 48-часового культивирования в озонированной среде обнаружены клеточные элементы, указывающие на терминальную стадию апоптоза, а также клеточные элементы с разрушенными мембранами (рис. 1, д).

При совместном использовании озона и доксорубина выявлен цитостатический эффект (рис. 1, е). Обнаруживаются отдельные клеточные элементы с характерной для данной линии морфологией, присутствуют клетки с поврежденными мембранами,

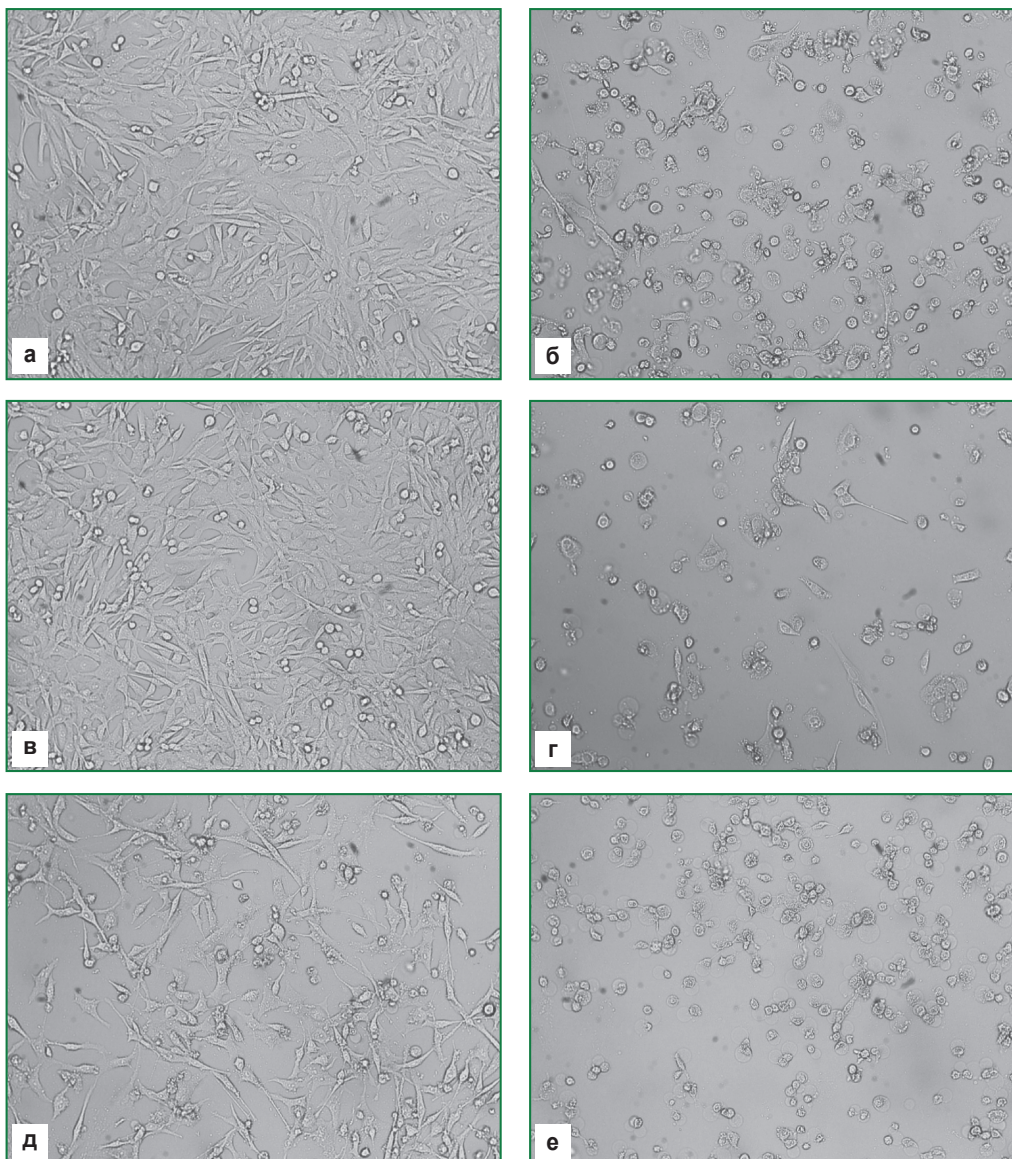


Рис. 2. Морфологическая структура злокачественных клеток печени человека SK-HEP-1 после воздействия окислителей и доксорубицина: а — интактные клетки; б — доксорубицин в дозе 0,004 мг; в — кислород; г — кислород с доксорубицином в дозе 0,004 мг; д — озон в концентрации 25 мг/л; е — озон в концентрации 25 мг/л с доксорубицином в дозе 0,004 мг

деляющиеся клетки не выявлены. За 48 ч после воздействия образования монослоя (как в контрольных сериях) не произошло. Однако количество погибших и открепившихся от подложки клеток было относительно небольшим.

В культурах клеток линии SK-HEP-1 добавление цитостатика также вызывает необратимые изменения в большей части клеток (рис. 2, б): они теряют форму, хроматин конденсируется, наблюдается массовая гибель. При этом форма небольшой части неделящихся клеток остается веретеновидной, характерной для данной линии. Делящихся клеток не обнаружено.

Совместное применение доксорубицина и кислорода не влияет на эффекты, оказываемые цитоста-

тиком (рис. 2, г). Применение озонированной среды вызывает выраженный цитостатический эффект (рис. 2, д), так как скорость достижения монослоя ниже. Однако через 48 ч после добавления озонированной среды к культуре наряду с большим количеством веретеновидных клеток обнаруживаются и делящиеся клетки.

Совместное применение доксорубицина и озона (рис. 2, е) приводит к необратимым последствиям для структуры клеточных элементов. Клеток с нормальной формой не обнаруживается: клеточные тела округлены, хроматин конденсирован, мембраны повреждены. Встречаются клеточные «тени» — как терминальная стадия некротической гибели.

Проведенный морфологический анализ показал, что совместное применение доксорубина и озона усиливает цитотоксический эффект каждого из данных веществ. Клетки аденокарциномы печени более устойчивы, чем клетки нормальной печени, как к озону, так и к доксорубину. Замена культуральной среды на среду, насыщенную кислородом, не влияет на морфологию клеток и линии аденокарциномы печени, и линии нормальной печени человека.

Таким образом, исследование жизнеспособности клеток печени выбранных линий и данные изменения их морфологической структуры убедительно свидетельствуют, что доксорубин обладает выраженной цитотоксичностью в отношении и нормальных клеток печени, и, особенно, злокачественных клеток печени. Применение кислорода в монорежиме не изменяет состав среды для клеточной культуры и не мешает пролиферации клеток. Сочетанное использование доксорубина и кислорода оказывает более выраженное действие на нормальные клетки, а не на злокачественные, отличающиеся более выраженной антиоксидантной системой защиты. Введение в культуральную среду озono-кислородной смеси проявляется снижением показателей жизнеспособности для злокачественных клеток печени. Сочетание доксорубина и озона сопровождается снижением жизнеспособности как нормальных, так и злокачественных клеток.

Заключение. Сочетанное применение озона и доксорубина оказывает цитостатический эффект на жизнеспособность нормальных и злокачественных клеток печени человека, приводит к необратимым последствиям для структуры клеточных элементов. Эффект озона сопоставим с действием доксорубина, что дает возможность подбирать способы введения озона — изолированно или в сочетании с доксорубином.

Финансирование исследования и конфликт интересов. Исследование не финансировалось какими-либо источниками, и конфликты интересов, связанные с данным исследованием, отсутствуют.

Литература/References

1. 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, <http://dx.doi.org/10.1126/science.7403859>.
2. Wolf H.H. *Das medizinische Ozon* [Medical ozone]. Heidelberg; 1982; 250 p.
3. Karlic H., Kucera H., Metka M., Schönbauer M., Söregi G. 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.
4. Zanker K.S., Krocze R. The mystery of molecule-ozone: antiproliferative, immunomodulative, synergistic to chemotherapy and carcinogenetic carcinogenic. In: *IX Congress of Ozone*. New York; 1989; p. 55–68.
5. Arnan M., DeVries L.E. Effect of ozone/oxygen gas mixture directly injected into the mammary carcinoma of the female C3H/HEJ mice. In: *Medical applications of ozone 1983*; p. 101–107.
6. Rodriguez Y., Bello J.L., Menendez S., et al. Antitumor activity of ozone. *Experimental research. Ozone News* 1997; 25(3): 50.
7. Алясова А.В., Конторщикова К.Н., Терентьев И.Г., Иванова И.П., Кузнецов С.С., Сазанов А.И. Влияние низких терапевтических концентраций озонированного физиологического раствора на патоморфоз опухоли в эксперименте. *Современные технологии в медицине* 2010; 4: 27–32. Alyasova A.V., Kontorshickova K.N., Terentiev I.G., Ivanova I.P., Kuznetsov S.S., Sazanov A.I. Influence of the ozonized physiologic salt solution low therapeutic concentrations on a tumor therapeutic pathomorphosis in experiment. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2010; 4: 27–32.
8. Бойко Н.Н., Сенькив Ю.В., Шляхтина Е.А., Ключивская О.Ю., Скороход Н.Р., Митина Н.Е., Скорохода Т.В., Москвин М.М., Заиченко А.С., Стойка Р.С. Действие доксорубина, доставленного в опухолевые клетки in vitro и in vivo новым наноразмерным функционализированным олигоэлектролитным носителем. *Biotechnologia Acta* 2013; 6(3): 53–62. Boyko N.N., Sen'kiv Yu.V., Shlyakhtina E.A., Klyuchivskaya O.Yu., Skorokhid N.R., Mitina N.E., Skorokhoda T.V., Moskvina M.M., Zaichenko A.S., Stoyka R.S. Action of doxorubicin delivered to tumor cells in vitro and in vivo by novel nanoscale oligoelectrolytic carrier. *Biotechnologia Acta* 2013; 6(3): 53–62.
9. Замулаева И.А., Пронюшкина К.А., Матчук О.Н., Яббаров Н.Г., Никольская Е.Д., Кондрашева И.Г. Комбинированное действие ионизирующего излучения и дендритных полимеров, нагруженных доксорубином, на раковые клетки молочной железы линии MCF-7. *Радиационная биология. Радиоэкология* 2015; 6: 591–597. Zamulaeva I.A., Pronyushkina K.A., Matchuk O.N., Yabbarov N.G., Nikol'skaya E.D., Kondrasheva I.G. Combined effect of ionizing radiation and dendritic polymers, loaded by doxorubicin on the breast cancer cells of MCF-7 line. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya* 2015; 6: 591–597.
10. Аникина Л.В., Пухов С.А., Дубровская Е.С., Афанасьева С.В., Ключков С.Г. Сравнительное определение жизнеспособности клеток с помощью МТТ и Ресазурина. *Фундаментальные исследования* 2014; 12(часть 7): 1423–1427. Anikina L.V., Pukhov S.A., Dubrovskaya E.S., Afanas'eva S.V., Klochkov S.G. Comparative definition of cell viability by MTT and Resazurin. *Fundamentalnie issledovania* 2014; 12(part 7): 1423–1427.
11. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65(1–2): 55–63, [http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).