

З. С. КЛЕСТОВА, доктор ветеринарних наук
А. К. ВОРОНІНА*, кандидат біологічних наук
В. С. ТАШУТА, аспірант

Інститут ветеринарної медицини НААН, м. Київ

**Інститут фармакології та токсикології НАМН, м. Київ*

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ДМСО НА КУЛЬТУРИ КЛІТИН ТВАРИН

При дослідженні in vitro з використанням культур клітин та тестових хімічних речовин, з метою визначення їх біологічних властивостей, не рідко застосовують різні розчинники. Одним із них є диметилсульфоксид (ДМСО). Нами досліджений цитотоксичний вплив різних концентрацій розчинника та обрані оптимальні для подальшої роботи при проведенні тестових досліджень в культурах клітин тварин.

Ключові слова: цитотоксичність, ДМСО, культура клітин

Проблеми регулювання найважливіших клітинних функцій, таких як проліферація, апоптоз, мають значення не тільки для розуміння фундаментальних основ життєдіяльності організму на різних рівнях його організації. Питання щодо регуляторних механізмів внутрішньоклітинних процесів залишається відкритим, а особливо при дії різних хімічних речовин, у тому числі і тих, які можуть в майбутньому скласти основу для фармакологічних препаратів. Проблема заключається в тому, що обробка клітин хімічними сполуками може супроводжуватись запуском процесів диференціювання або їх апоптозу. Рівновага між проліферацією і загибеллю клітин є визначальним фактором нормального розвитку організму.

Порушення контролю клітинної загибелі в процесі росту і розвитку тканин та органів може призвести до виникнення різних патологічних станів. Апоптична загибель може бути запущена різними фізичними, хімічними і біологічними факторами, але фінальні фази процесу перебігають подібним чином, незалежно від індуктора загибелі і типу клітин. При дослідженні впливу хімічних речовин на зміну біологічних властивостей клітин та вірусів (при титруванні противірусних властивостей) необхідно визначитись з розчинником цих речовин, його дозуванням та терміном впливу на клітини.[1].

Застосування ДМСО у медицині. Дозвіл на медичне застосування ДМСО (димексиду) на території СРСР був наданий в 1971 році Фармакологічним комітетом Міністерства охорони здоров'я СРСР.

За хімічною будовою димексид – диметил сульфоксид, цвітеріон. Вважали, що димексид є «аспірином» 21 сторіччя за поєднання його протизапальних, імунодепресивних, трофічних і провідникових властивостей. На сучасному етапі література нараховує біля 2000 повідомлень щодо біологічних і клінічних ефектів цього препарату.[2].

Впровадження його в медицину пов'язано з дослідником, який вперше у 1964 році описав незвичні властивості цієї сполуки. Вже у 1966 році у США було дозволено медичне застосування ДМСО.

Температура плавлення ДМСО – 18,4°C, температура кипіння – 189°C, густина – 1,11 г/см³, молекулярна маса – 78,13. Максимум поглинання лежить в області ультрафіолетового спектру, а саме, при 210 нм. ДМСО здатен утворювати солі, розчиняти органічні і неорганічні сполуки, володіє вираженими кислотними властивостями. При розчиненні медикаментів, не знижує фармакологічні ефекти лікувальних препаратів. Має неспарений електрон у атома кисню. Взаємодіє з водою, білками, нуклеїновими кислотами. ДМСО володіє унікальними властивостями, такими як, стабільність, висока полярність, виключна розчиняюча здатність, є сильним окислювачем, поверхнево – активною речовиною. Володіє катіон-акцепторними властивостями. Конкурує з водою за водневі зв'язки. Здатен виштовхувати воду, з'єднуючись з білками, міняючи їх конформаційні властивості. ДМСО здатен розчиняти анестетики, антибіотики, вітаміни, гепарин. Сольові сполуки в ньому дисоціюють, гігроскопічний.

У медичній практиці застосовують з різною метою:[2,3,4,5] для поліпшення мікроциркуляції в мозковій тканині та інших частинах тіла, наприклад в тканинах суглобів. ДМСО зменшує час згортання крові, покращує мікроциркуляцію у вогнищі запалення. Має судинорозширювальну дію, володіє помірно вираженим гіпотензивним ефектом, зменшує адгезивність і агрегацію формених елементів крові.

ДМСО легко проникає через шкіру і клітинні мембрани, не пошкоджуючи їх. Деponує лікарські речовини в тканинах на 1 – 2 тижні.

Порушує гідрофобні зв'язки і ліпопротеїнові комплекси клітинних мембран, що лежить в основі підвищення їх проникності під впливом ДМСО. Володіє не тільки місцевими, але і системними протизапальними властивостями. ДМСО має пряму антипротеолітичну дію, попереджує розвиток набряків і некрозу, гальмує агрегацію тромбоцитів. Стимулює репаративні процеси в тканинах, проліферативні процеси у вогнищі запалення. ДМСО взаємодіє з продуктами розпаду білку, утворюючи міжмолекулярні (водневі і гідрофобні) зв'язки з функціональними групами поліпептидів – OH, NH, SH, NH₂. ДМСО пригнічує проліферацію фібробластів, а у поєднанні з кортикостероїдами повністю їх пригнічує.[2].

При дослідженні в пухлинних клітинах (K562) найменший токсичний ефект проявляють концентрації ДМСО 0,1 – 0,5%, при цьому життєздатність клітин становила більше 90%, не модулювала фрагментації ДНК в клітинах та мала місце тільки модуляція його диференціюючої активності по відношенню до пухлинних клітин, що використовують в якості індукції диференціювання клітин.[1].

Крім того, якщо привести приклади спектру застосування ДМСО в гуманній медицині, слід згадати такі галузі, як психіатрія, неврологія, офтальмологія, отоларингологія, пульмонологія, гастроентерологія, ревматологія, нефрологія, урологія, гінекологія, хірургія, клінічна онкологія та радіологія, дерматологія. [2,3,4,5,8].

Але, незважаючи на широке застосування, слід зауважити на тому, що відомості щодо застосовуваних доз досить різні, а в деяких випадках і протиріччів.[9].

Наприклад, в психіатрії застосовують в/м'язове введення 50% розчину ДМСО, в неврології – 10-40% розчини при в/венному введенні, в офтальмології – у вигляді очних крапель 75-66% концентрації, в отоларингології – 30-50% розчин ДМСО застосовують для промивання порожнин, в пульмонології – 10-20% розчин застосовують в/венно, в нефрології – 3-5% розчин ДМСО перорально, в урології – 50% розчин, в гінекології – 10% розчин, в хірургії – зовнішньо 70% розчин, в

онкології – 30-50% та в радіології – 90% розчини зовнішньо. Слід відмітити, що досить високі рівні концентрацій ДМСО при лікуванні викликають і небажані побічні ефекти, такі як подразнення різного ступеня.[2].

Описаний диференціюючий ефект 1-2 % розчину ДМСО і на клітини остеосаркоми в культурі клітин. Диференціююча концентрація препарату в культурі – 0,75-7%. Концентрація 3% димексида викликає також і диференціювання клітин раку шийки матки. З іншого боку низькі дози реагенту можуть стимулювати диференціювання пухлинних клітин, яке в залежності від умов може бути як зворотнім, так і не зворотнім, (термінальним). [2]. Фінальним етапом термінального диференціювання є апоптоз клітин.

Слід згадати, що під впливом ДМСО виявили появу невеликої кількості однострункових розривів ДНК, що призводить до зміни конформації ДНК, до зміни кількості генів, що функціонують у клітині (щоправда ці дослідження провели на пухлинних клітинах). ДМСО викликає вибіркочку загибель ембріональних кровотворних клітин. [1].

Також ДМСО впливає на обмінні процеси в тканинах, а саме, він здатен знижувати потребу тканин у кисні приблизно на 25%, при цьому розвивається гіпоксія тканин і зменшення в клітинах утворення АТФ, що може бути позитивним моментом, як один з механізмів при радіозахисній дії (при опроміненні), але зовсім не позитивним моментом для нормальних клітин. [8].

Інші галузі застосування ДМСО. Як відомо, ДМСО використовують як кріопротектор для кріоконсервування клітин з ядром. Так, наприклад, вивчали дію різних його концентрацій на здатність до проліферації ізольованих нервових клітин новонароджених пацюків. Встановили, що 7,5% та 10% – оптимальні концентрації, при яких нервові клітини новонароджених пацюків зберігали здатність до проліферації і диференціювання після кріоконсервування. [6].

Захисна дія ДМСО як кріопротектора основана на високій швидкості проникнення через клітинну мембрану і утворення великої кількості водневих зв'язків з молекулами рідкої фази клітини. Однак, крім кріозахисних властивостей, ДМСО володіє токсичним впливом по відношенню до заморожуваних об'єктів. [6].

Автори вивчали вплив концентрацій 2,5%, 5%, 7,5%, 10%, та 12,5% ДМСО. Є відомості про виражену токсичну дію ДМСО в концентраціях вище за 12% [7,10].

Як виявили, додавання ДМСО до свіжо приготованої суспензії нервових клітин знижувало життєдіяльність і зменшувало їх кількість в середовищі як без сироватки, так і з сироваткою. При цьому, зниження життєздатності і концентрації клітин спостерігали вже після додавання 2,5% ДМСО. Підвищення концентрації ДМСО до 5% достовірно не змінювало життєздатність і кількість клітин в порівнянні з 2,5% ДМСО, а при концентрації ДМСО 7,5% знижувалась життєздатність і концентрація нервових клітин на 30-35% та 29% відповідно в порівнянні із зразками клітинних суспензій, не утримуючих ДМСО. Підвищення концентрації ДМСО до 10 та 12,5% в середовищі не призводило до змін у кількості клітин, але при цьому спостерігали суттєве зниження життєздатності клітин на 57% при застосуванні 10% ДМСО та на 76% – при 12,5% ДМСО [6].

Підвищення проникності клітинної мембрани і токсичний ефект ДМСО є наслідком змін структури мембрани в його присутності [11,12]. Ступінь таких змін залежить від концентрації сполуки, внаслідок яких порушується гомеостаз клітин і

змінюються міжмембранні взаємодії, що в свою чергу, може індукувати апоптоз клітин. Однак, якщо проникність клітин змінюється одразу при додаванні ДМСО до клітин, то для прояву токсичної дії ДМСО необхідний час і умови *in vivo* чи *in vitro* [6]. Виявили, що обробка ДМСО мієлоїдних клітин HL-60, K562 і лімфоїдних клітин Raji, Daudi, СЕМ, L1210 індукує зниження кількості мРНК с-Мус [1].

ДМСО широко використовується як розчинник для сполук нерозчинних у воді [1]. При проведенні досліджень для оцінки токсичних ефектів ДМСО на клітини при використанні його як криопротектора [6, 13], використовували тільки короткі періоди експозиції клітин з ДМСО, клітини заморожували і розморожували. Довгострокові експерименти впливу ДМСО на клітини, які піддаються його дії протягом тривалого часу необхідні. Клітинні культури використовуються для прогнозування і тестування біологічних ефектів біологічно активних сполук, деякі з яких, нерозчинні у воді, але добре розчиняються в ДМСО [1,12]. Необхідно оцінити максимально безпечну кількість ДМСО, як розчинника для використання у вивченні клітинної токсичності різних сполук протягом декількох днів.

Метою досліджень було вивчити цитотоксичні властивості ДМСО та визначити його нетоксичні дози для перещеплюваних культур клітин тварин.

Матеріали і методи. В дослідженні використовували дві біологічні системи – перещеплювані культури клітин: СНЕВ (свиняча нирка ембріональна версенізована) і SK-6 (нирка свині). Культури клітин вирощували в пластикових планшетах, використовуючи поживне середовище ДМЕМ з додаванням 10% сироватки КРС (ембріональної сироватки телят), відповідно до загальноприйнятих методик, в умовах CO² інкубатора при 5% CO² і вологості 88%.

Досліджували вплив на культури клітин наступних варіантів розчинники:

- ДМСО (диметилсульфоксид, виробництва корпорації «Артеріум», АТ Галичфарма», фармакологічна форма) не автоклавований.

- ДМСО (диметилсульфоксид, виробництва корпорації «Артеріум», АТ Галичфарма», фармакологічна форма) автоклавований.

- DMSO хімічно чистий (Fluca) не автоклавований;

- ДМСО (комерційний засіб, виробництва ПАТ «Луганський хімфармзавод», фармакологічна форма) автоклавований.

Таким чином, в зв'язку з наявністю величезної кількості суперечливих даних, які наведені в науковій і медичній літературі відносно токсичності різних концентрацій ДМСО і рівня доз, які застосовуються, ми досліджували наступні концентрації ДМСО:

на культурі клітин СНЕВ: 0,1%; 0,2%; 0,3%; 0,4%; 0,5%; 0,6%; 0,8%; 1%; 1,25%; 1,5%; 1,89%; 2,5%; 3,5%; 5%; 7%; 10%; 20%.

на культурі клітин SK-6: 0,3 %; 0,4 %; 0,5 %; 0,75 %; 0,9 %; 1,25; 1,6 %; 1,8 %; 2 %; 2,5 %; 3,0 %.

Було досліджено вплив процесу стерилізації (автоклавування) ДМСО стосовно його цитотоксичних властивостей для застосування в вище зазначених культурах клітин тварин. Режим автоклавування – при 0,5 атмосфер 30 хвилин і при 1 атмосфері 30 хвилин. Крім того, досліджували розчини ДМСО, які не піддавали автоклавуванню.

При визначенні цитотоксичної дії ДМСО проводили візуальне мікроскопічне дослідження дослідних та контрольних культур клітин. Ступінь цитотоксичності визначали за зміною морфології клітин. З використанням світлового

мікроскопу спостерігали за станом моношару клітин: часткової або повної деструкції моношару клітин, пошкодження окремих клітин. Контролем слугували лунки з моношаром, в які було внесено живильне середовище без ДМСО.

Результати і їх обговорення. Результати дослідження цитотоксичності різних концентрацій ДМСО на культурі клітин СНЕВ представлені в таблиці 1. Наведені дані свідчать, що для культури клітин СНЕВ ДМСО в концентраціях 0,04 – 1,89 % виявився нетоксичним. Починаючи з вищих концентрацій ДМСО, уже на 2-й день обліку результатів, спостерігали дегенеративні зміни в морфології клітин.

Для культури клітин SK-6 ДМСО виявився більш токсичним, або ця культура клітин чутливіша до дії розчинника, ніж культура клітин СНЕВ. Наведені в таблиці 2 дані свідчать, що ДМСО спричиняв цитотоксичну дію на вказану культуру клітин уже в концентрації 1,6 %.

У результаті досліджень нами встановлено наступну дію розчинів ДМСО (МДК – максимально допустима концентрація):

МДК ДМСО для культури клітин СПЕВ – 1,89%;

МДК ДМСО для культури клітин SK-6 – 1,25%

Таким чином, культура клітин SK-6 більш чутлива до дії розчинника ДМСО, що необхідно враховувати при проведенні досліджень з її використанням.

При проведенні порівняльних властивостей ДМСО після стерилізації автоклавуванням варіантів препаратів, які не пройшли процес автоклавування було виявлено, що достовірних змін під їх дією на моношар культур клітин не виявили. Таким чином, при паралельній роботі можливо використовувати ДМСО в якості розчинника без його стерилізації із застосуванням автоклавування. Тим більше, що ми виявили, що протягом спостережень і щоденному обліку результатів впродовж 6 днів у культурі клітин, до яких було внесено нестерилізований розчин ДМСО, контамінації сторонньою мікрофлорою не виявили. Це свідчить про виражену бактерицидну дію препарату, що підтверджують дослідження і інших авторів [2]. Так, наведені відомості про те, що завдячуючи сильним окислювальним властивостям, димексид є антисептиком. Бактеріостатичною дією володіють 0,25-10% розчини ДМСО, а 25-50% розчини вже – бактерицидні. За даними багатьох авторів 20% розчину препарату властива здатність пригнічувати проростання спор. При нанесенні на шкіру ДМСО зменшує резидуальну флору на 95%. Усуває набуту мікроорганізмами резистентність до антибіотиків. Володіє бактерицидною дією по відношенню до розповсюджених патогенних і умовно-патогенних бактерій.

Таким чином, нами експериментально підтверджена дія ДМСО при застосуванні його, як розчинника нестерильних тестованих хімічних речовин, що дає змогу проведенню подальших досліджень в культурах клітин без застосування додаткових методів стерилізації, таких, наприклад, як автоклавування.

Таблиця 1

Результати оцінки цитотоксичності ДМСО для культури клітин СПЕВ

Концентрація ДМСО, %	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,8	1	1,25	1,5	1,89	2,5	3,5	5	7	10	20
Токсичність	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Т	Т	Т	Т	Т	Т

Примітка, в таблицях 1,2:

- відсутність токсичної дії;

Т- токсичність

Результати оцінки цитотоксичності ДМСО для культури клітин SK-6

Концентрація ДМСО, %	0,3	0,4	0,5	0,75	0,9	1,25	1,6	1,8	2	2,5	3
Токсичність	-	-	-	-	-	-	Т	Т	Т	Т	Т

Висновки

1. Максимальна нетоксична концентрація ДМСО для культури клітин СНЕВ являється – 1,89 %, а для культури клітин SK-6 – концентрація 1,25 %.

2. Встановлено, що процес стерилізації розчинів ДМСО методом автоклавування не збільшує їх цитотоксичні властивості для перещеплених культур клітин тварин порівняно з розчинами ДМСО, які не піддавались такій обробці.

Список використаної літератури

1. Волкова Т. О. Цитотоксическое и апоптогенное действие индукторов дифференцировки клеток линии K562: дис. К.б.н.: 03.00.25./ Т. О. Волкова. – 2001. – 143с.

2. Григорович Н. А. Нанотехнологический лекарственный препарат – димексид / Н. А Григорович, С. Ф. Дорофтиенко, Т. М. Григорович// Минск.

3. Бойко Н.Н. Влияние различных концентраций и сочетаний растворов димексидна на течение раневого процесса / Н.Н. Бойко // Клин. Хирургия. – 1979. – №1. – С.64-65.

4. Даниленко М. В., Туркевич Н. М. Клиническое применение димексидна. / М. В. Даниленко, Н. М. Туркевич. // Киев. Здоровье. – 1976. –с.87

5. Дацковский Б. М. Диметилсульфоксид (фармакология, применение в дерматологии и смежных специальностях). В кн.: Вопросы экспериментальной дерматологии. / Б. М. Дацковский, А. С. Закс, Л. С. Митрюковский. / – Пермь. – 1973. – С.3-82.

6. Ляшенко Т. Д. Влияние различных концентраций ДМСО и замораживания – отогрева на сохранность нервных клеток новорожденных крыс /Т. Д. Ляшенко, А. Н. Сукач// Проблемы криобиологии. – 2011. – Т. 21, №3. – С. 263 – 272.

7. Malinin T. I. Toxicity of dimethyl sulfoxide on Hella cells/ T. I. Malinin, V. P. Perry // Cryobiology. – 1967. – V. 4, №2. – P. 90-96.

8. Кирьянов И. Ю. Применение демитисульфоксида (ДМСО) в экспериментальной и клинической радиологии / И. Ю. Кирьянов, А. С. Барыбин, В. А. Михалченко // Медицинская радиология. – 1976. – № 8. – С. 73-80.

9. Pal, R et al. Diverse effects of dimethyl sulfoxide (DMSO) on the differentiation potential of human embryonic stem cells //Arch. of toxicology.- 2012.- V. 86.- I. 4.- P. 651-661.// DOI: 10.1007/s00204-011-0782-2 Abstract.

10. Tomford W. W. Studies on cryopreservation of articular cartilage chondrocytes/ W. W. Tomford, G. R. Fredericks, A. J Mankin // J. Bone Joint Surg. Am. – 1984. – V. 66, №2. – P. 253-259.

11. Gordeliy V. I. Lipid membrane structure and interactions in dimethyl sulfoxide water mixtures / V. I. Gordeliy, M. A. Kiselev, P. Lesieur et al // Biophys. J. – 1998. – V. 75, №5. – P. 234-235.

12. Yu Z. W. Phase stability of phosphatidylcholines in dimethylsulfoxide solutions / Z. W. Yu, P. J. Quinn // Biophys. J. – 1995. – V. 69, №4. – P. 1456-1463.

13. Rowley S. D., Anderson G. L. Effect of DMSO exposure without cryopreservation on haemopoietic progenitor cells //Bone Marrow Transplant.– 1993.– Vol. 11, N5.– P. 389–393.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ДМСО НА КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ЖИВОТНЫХ / З.С. Клестова, А.К. Воронина, В.С.Ташута

При исследовании в системе in vitro с использованием культур клеток и тестовых химических веществ, с целью определения их биологических свойств, нередко применяют различные растворители. Одним из них является диметилсульфоксид (ДМСО). Нами исследовано цитотоксическое влияние различных концентраций растворителя и выбраны оптимальные для дальнейших исследований в культурах клеток животных.

Ключевые слова: цитотоксичность, ДМСО, культура клеток

INVESTIGATION OF DMSO INFLUENCE IN ANIMAL CELL CULTURES / Z.S. Klestova, A.K. Voronin, V.S.Tashuta

In vitro studies using cell culture and testing of chemicals to determine their biological properties, often use a variety of solvents. One of them is dimethyl sulfoxide (DMSO). We studied the cytotoxic effects of different concentrations of solvent and choose the best for the future work in conducting research in the test animal cell cultures.

Key words: cytotoxicity, DMSO, cell culture

Рецензент – кандидат ветеринарных наук **И. М. Полупан**