

1 – ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6

2 – ФГБН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334, Россия, г. Москва, ул. Вавилова, 26

3 – ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, 117997, г. Москва, Россия, ул. Островитянова, 1

1 – Peoples' Friendship University of Russia, 6, Miklukho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

2 – Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, 26, Vavilova str., Moscow, 119334, Russia

3 – Pirogov Russian National Research Medical University, 1, Ostrovityanova str., Moscow, 117997, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: agentcat85@mail.ru
Тел.: 8 (499) 936 85 99

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИТОСТАТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ПРОТАРГОЛА НА ФИБРОБЛАСТЫ ДЕРМЫ ЧЕЛОВЕКА

Н.В. Мещерякова^{1,3}, Э.Б. Дашинимаев^{2,3}, А.И. Марахова^{1*}

Резюме. В статье представлены данные по изучению влияния различных концентраций протаргола на жизнедеятельность фибробластов. Для оценки метаболической активности клеток использовали МТТ-тест – колориметрический тест, основанный на способности НАДФ-Н-зависимых оксидоредуктазных ферментов отображать количество жизнеспособных клеток. Установлено, что критическая концентрация протаргола, оказывающая максимально ингибирующее действие на пролиферацию фибробластов дермы, находится в диапазоне $2 \cdot 10^{-2}$ – $5 \cdot 10^{-1}$ мг/мл.

Ключевые слова: наночастицы, коллоидное серебро, цитостатическое действие, фибробласты дермы человека.

DEFINITION OF CYTOSTATIC EFFECT OF PROTARGOLUM SOLUTIONS IN DIFFERENT CONCENTRATIONS ON HUMAN DERMAL FIBROBLASTS

N.V. Mescheryakova^{1,3}, E.B. Dashinimaev^{2,3}, A.I. Marakhova^{1*}

Abstract. This article presents the data on the effect of protargolum solutions in different concentrations on human dermal fibroblasts. For evaluation of the metabolic activity of the cells MTT-test was used. This test is based on the ability of NAD-H-adjecitive oxydoreductases to represent the amount of viable cells. It was determined, that the critical concentration of protargolum solution, responsible for inhibitory effect on fibroblasts proliferation is on the range $2 \cdot 10^{-2}$ – $5 \cdot 10^{-1}$ mg/ml.

Keywords: nanoparticles, colloidal silver, cytostatic effect, human dermal fibroblasts.

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день причиной смерти четверти населения планеты являются различные бактериальные и грибковые инфекции. Одной из причин неэффективного лечения антибиотиками является развитие резистентности к ним микробов. Наночастицы металлов и их оксидов обладают значительным антимикробным действием и являются наиболее перспективными заменителями антибиотиков [1]. Наиболее часто находят применение соединения серебра, как правило используемые местно. Давно применяются в медицинской практике в качестве антисептических, противовоспалительных средств местного действия такие препараты, как колларгол и протаргол [2].

Несмотря на ряд опубликованных научных работ о влиянии наночастиц серебра на живой организм, данные весьма разрозненны. Механизмы воздействия наночастиц на клеточном уровне изучены недостаточно, особенно скудно в литературе представлены данные, касающиеся внутриклеточных изменений, возникающих в коже при взаимодействии с наночастица-

ми. Описанные же результаты исследований нередко противоречат друг другу. До сих пор не сложилась методология прогноза генотоксического риска применения наночастиц человеком [3].

Все вышесказанное обуславливает актуальность систематического и углубленного изучения влияния наночастиц серебра на метаболические процессы, протекающие в живой клетке.

Целью настоящего исследования стало определение цитотоксического действия различных концентраций протаргола на фибробласты дермы человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа с клеточной культурой

Линия иммортализованных фибробластов кожи человека 1608-hTERT была любезно предоставлена доктором Е.Е. Егоровым (ИМБ РАН, г. Москва, Россия). Данные клетки были выделены из кожи соматически здорового донора и иммортализованы при помощи введения гена каталитического компонента теломеразы (hTERT) под конститутивно-

активно работающим промотором CMV [4]. Все работы с клетками производили в стерильных условиях ламинарного шкафа 2-го уровня биобезопасности. Выращивание клеток проводили в культуральных флаконах и 96-луночных плоскодонных планшетах на полной питательной среде (DMEM, 2 ммоль L-глутамин, 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина, 10% ЭТС) в CO₂-инкубаторе с подавлением кислорода, при +37°C, 5%O₂, 5%CO₂, 100% влажности. Пересев клеток осуществляли при помощи растворов Версена и трипсин-ЭДТА по стандартной методике [4]. Осаждение клеток осуществляли в центрифуге при 1200–1500–1800 об/мин при комнатной температуре.

Инкубирование клеточной культуры с протарголом

Протаргол растворяли в ППС в концентрации 20 мг/мл, данную концентрацию принимали за 100%-й стоковый раствор протаргола. На третий

день культивирования фибробластов на 96-луночных планшетах во всех лунках производили замену среды с добавлением раствора протаргола согласно таблицам 1, 2. Смену среды производили каждый четвертый день.

Постановка МТТ-теста-1, -2

Было проведено два МТТ-теста (МТТ-тест-1, МТТ-тест-2). Снятие результатов производилось на 2, 4, 6, 8, 10-й (МТТ-тест-1, МТТ-тест-2) дни культивирования фибробластов с протарголом. При проведении МТТ-теста в каждую лунку (кроме крайних) планшета добавляли по 10 мкл МТТ (5 мг/мл). Содержимое лунок планшета перемешивали на шейкере в течение 5 мин. Инкубировали планшет 4 ч при 37 °C и 5% CO₂. Затем супернатант удаляли, формазан растворяли в 150 мкл ДМСО, планшет инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре. Оптическая плотность снималась при длине волны 595 нм (при длине волны сравнения 655 нм).

Таблица 1.

Распределение назначения лунок для МТТ-теста-1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
B	PBS	ППС	контроль	100%	75%	50%	40%	30%	20%	10%	5%	PBS
C	PBS	ППС	контроль	100%	75%	50%	40%	30%	20%	10%	5%	PBS
D	PBS	ППС	контроль	100%	75%	50%	40%	30%	20%	10%	5%	PBS
E	PBS	ППС	контроль	100%	75%	50%	40%	30%	20%	10%	5%	PBS
F	PBS	ППС	контроль	100%	75%	50%	40%	30%	20%	10%	5%	PBS
G	PBS	ППС	контроль	100%	75%	50%	40%	30%	20%	10%	5%	PBS
H	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS

Примечание: PBS – фосфатно-солевой буфер, контроль – контрольные лунки без добавления протаргола, ППС – полная питательная среда, n% – объемное содержание стокового раствора протаргола.

Таблица 2.

Распределение назначения лунок для МТТ-теста-2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
B	PBS	ППС	контроль	5%	2,5%	1%	0,5%	0,1%	0,05%	0,01%	0,001%	PBS
C	PBS	ППС	контроль	5%	2,5%	1%	0,5%	0,1%	0,05%	0,01%	0,001%	PBS
D	PBS	ППС	контроль	5%	2,5%	1%	0,5%	0,1%	0,05%	0,01%	0,001%	PBS
E	PBS	ППС	контроль	5%	2,5%	1%	0,5%	0,1%	0,05%	0,01%	0,001%	PBS
F	PBS	ППС	контроль	5%	2,5%	1%	0,5%	0,1%	0,05%	0,01%	0,001%	PBS
G	PBS	ППС	контроль	5%	2,5%	1%	0,5%	0,1%	0,05%	0,01%	0,001%	PBS
H	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS

Примечание: PBS – фосфатно-солевой буфер, контроль – контрольные лунки без добавления протаргола, ППС – полная питательная среда, n% – объемное содержание стокового раствора протаргола.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведения МТТ-теста-1, -2 (4-й, 10-й дни) представлены на рисунках 1, 2.

С понижением концентрации протаргола наблюдается постепенное снижение выживаемости клеток. Максимальное снижение имеет место при $2 \cdot 10^{-2}$ – $5 \cdot 10^{-1}$ мг/мл. При концентрации ниже $1 \cdot 10^{-2}$ мг/мл имеет место значительное повышение выживаемости клеток. Кроме того, не выявлено существенных изменений влияния протаргола на клетки в разные дни культивирования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, цитотоксичность протаргола на дермальные фибробласты человека зависит от концентрации лекарственного препарата, однако не находится в линейной зависимости от нее. Критическая концентрация протаргола, оказывающая максимальное цитотоксическое действие на фибробласты дермы человека, находится в диапазоне $2 \cdot 10^{-2}$ – $5 \cdot 10^{-1}$ мг/мл. Также не выявлено существенных изменений влияния протаргола на клетки в зависимости от времени культивирования, что может указывать на отсутствие накопительного эффекта.

ЛИТЕРАТУРА

1. S.T. Khan, J. Musarrat, A.A. Al-Khedhairi. Countering drug resistance, infectious diseases, and sepsis using metal and metal oxides nanoparticles: Current status // *Colloids Surf. B. Biointerfaces*. 2016. V. 146. P. 70–83.
2. Е.С. Березина, М.М. Смирнова, А.В. Петухова. Технологические аспекты и методы контроля растворов колларгола и протаргола различных концентраций // *Актуальные проблемы науки фармацевтических и медицинских вузов: от разработки до коммерциализации: Материалы научно-практической конференции с международным участием, посвященной 75-летию ПГФА*. Пермь. 2011. С. 47–50.
3. А.Д. Дурнев. Оценка генотоксичности наночастиц при использовании в медицине // *Гигиена и санитария*. 2014. № 2(93). С. 76–83.
4. Е.Е. Егоров, М.В. Молдавер, Х.С. Вишнякова, С.М. Терехов и др. Усиление контроля пролиферации в теломеризованных клетках // *Онтогенез*. 2007. Т. 38. № 2. С. 105–119.

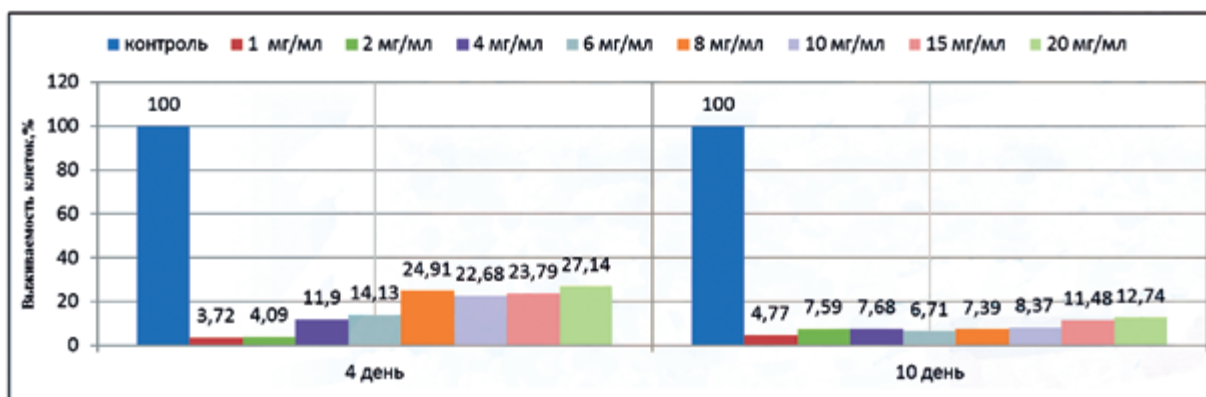


Рисунок 1. Результаты МТТ-теста-1

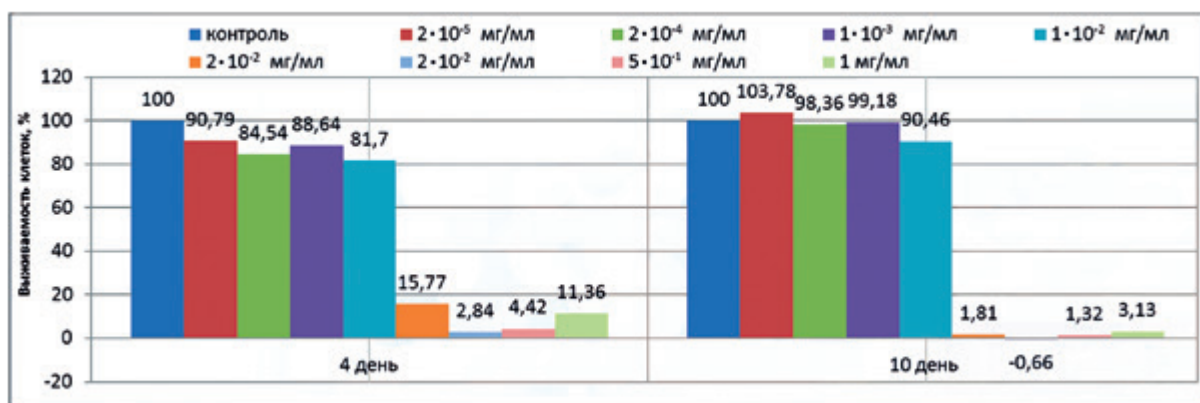


Рисунок 2. Результаты МТТ-теста-2