

УДК 669.162.252.24

<https://doi.org/10.21603/-I-IC-155>

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕЗАЗУРИНОВОГО ТЕСТА ДЛЯ ОЦЕНКИ ВЫЖИВАЕМОСТИ КЛЕТОК MRC-5 ЭКСПОНИРОВАННЫХ УГОЛЬНО-ПОРОДНЫМИ ПЫЛЕВЫМИ ЧАСТИЦАМИ

О.С. Яковенко*, Е.Д. Вдовина*, А.С. Зверев*, А.В. Ларионов*

* Кемеровский государственный университет, г. Кемерово, Россия

Аннотация

Цель: оценить применимость метода флуоресцентного выявления продукта митохондриального восстановления резазурина – резаруфина для оценки жизнеспособности культуры фибробластов легких MRC-5 экспонированных пылевыми частицами угольно-породного происхождения от 10 мкм до 100 нм. Накопление продукта реакции происходит линейно, что отражает биохимической активностью клеток. Для каждой пробы были получены уравнения вида $y=ax+b$, где коэффициент «а» пропорционален активности и числу живых клеток. В то же время ряд углеродных продуктов может исказить результаты.

Ключевые слова: резазурин, резаруфин, краситель alamarBlue, угольно-породные частицы, PM10, MRC-5.

Клеточные культуры являются незаменимым объектом экотоксикологических исследований. Они позволяют тестировать эффекты соединений, определять их влияние на пролиферацию, функционирование органелл, оценивать их цито- и генотоксичность при этом важна точность определения выживаемости клеток. Относительно простым методом, предусматривающим измерение флуоресценции является измерение характеристик реакции восстановления резазурина (alamarBlue). Краситель используется в гомогенном состоянии и более чувствителен, чем МТТ метод. Кроме того, благодаря тому, что резаруфин растворим в воде и проникаем для клеточной мембраны не требуется солубилизовать продукт в конце реакции. [1,2]

Резазурин представляет собой маломолекулярный феноксазин-3-онный краситель, который может восстановиться до резаруфина в присутствии митохондриальных или цитоплазматических редуктаз. Присутствие резаруфина можно колориметрически зарегистрировать при длине волны $\lambda_{max} = 570$ нм. Так же можно использовать более чувствительный способ измерения- флуориметрический, при длине волны возбуждения 530-560 нм и длине волны излучения 590 нм [3]. Кривая увеличения резаруфина имеет линейный диапазон, ограниченный колебаниями температуры, рН и начальной концентрации резазурина. Некоторые клетки способны восстановить резаруфин до дигидрорезаруфина. Данное вещество не проявляет флуоресценцию и является токсичным для клеток.

Резазурин относительно малотоксичен и может применяться в присутствии многих факторов роста и неорганических субстанции, включая наночастицы, например диоксид титана [4]. Рабочая гипотеза предусматривает, что резазурин восстанавливается жизнеспособными клетками с постоянной скоростью в присутствии угольно-породных потенциально генотоксичных частиц, применение метода возможно для оценки токсических эффектов пылевых частиц *in vitro*.

Материалы и методы.

В качестве модели использовалась диплоидная культура клеток эмбриональных фибробластов легких человека MRC-5 (пассаж 23). Культуры клеток выращивали на питательной среде Iglа-MEM (89%) с использованием раствора неосновных аминокислот (1%) и фетальной телячьей сыворотки (10%) в атмосфере 5% CO₂. Пенициллин-стрептомицин был использован в качестве антибиотика в концентрации 25 000 ЕД на 500 мл среды.

Концентрация клеток составляла 100 тысяч клеток на 1 мл среды. Период культивирования составлял 72 ч. Для удаления клеток использовали раствор трипсин-версена (1:1). Реакцию останавливали добавлением свежей питательной среды. Для эксперимента с пылевыми частицами культуру высаживали в 6-луночные планшеты (площадь лунки 9 см²), после чего ее культивировали в течение 24 ч. Конечная концентрация образцов PM10 составила 0,25, 0,5, 1 мг/мл. После 6 ч с РМ, ростовую среду удаляли, монослой промывали свежей средой для удаления РМ.

Для определения жизнеспособности вносили 1 мл раствора резазурина до концентрации 4мг/мл. Последовательно отбирались пробы объемом 50 мкл через 0, 15, 30, 45, 60 и 75 минут после внесения резазурина. Отобранные пробы разбавлялись в 5 мл деионизированной воды. Для всех отобранных проб были зарегистрированы спектры люминесценции в диапазоне длин от 535 до 700 нм с шагом 1 нм при возбуждении 535 нм и спектры поглощения в том же спектральном диапазоне. Для измерения спектров люминесценции использовался сканирующий спектрофлуориметр Флюорат-02 «Панорама», а для абсорбционных спектров сканирующий спектрофотометр Shimadzu UV-3600. Спектры люминесценции были исправлены с помощью измеренных абсорбционных спектров, для учета поглощения возбуждающего и люминесцентного света присутствующим в растворе резазурином. Были построены зависимости люминесцентного сигнала от времени, которые аппроксимировались линейными зависимостями. Выпадающие точки, обусловленные, по-видимому, ошибками при пробоотборе в аппроксимации не учитывались.

Результаты и обсуждение.

Зависимость интенсивности люминесценции от времени приведены на рис. 1.

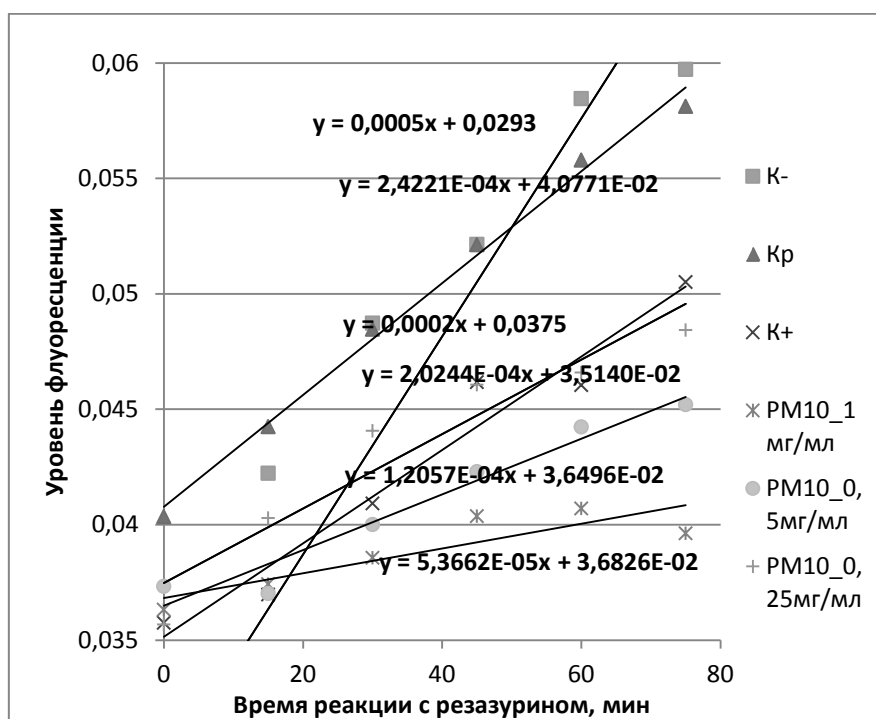


Рис.1 Зависимости интенсивности люминесценции проб от времени отбора

Интенсивность люминесценции линейно связана с концентрацией резорфина. Так как измерения проводились в непродолжительный начальный период времени в избытке субстрата, резазурина, они должны описываться линейной зависимостью вида $y=ax+b$. Где коэффициент «а» имеет смысл активности и пропорционален числу живых клеток. Наибольшее значение отмечено в пробах отрицательного контроля и контроля разведения (изотонический раствор натрия хлорида, аналогичный использованному для разведения

пылевых проб). В качестве положительного контроля использован наноразмерный порошок гидроксида алюминия. Пылевые частицы показали значительную токсичность, наиболее высокую у образца с концентрацией 1 мг/мл и среднюю у 0,5 и 0,25 мг/мл соответственно. Линейный характер процесса указывает на отсутствие токсического воздействия, что позволяет использовать резазуриновый тест для оценки жизнеспособности клеток в условиях воздействия пылевых частиц.

Использованные для эксперимента пылевые частицы угольно-породного происхождения размером менее 10 мкм, выделены вблизи объекта открытой добычи угля и были охарактеризованы ранее. Данные частицы преимущественно включают кристаллическую фазу неуглеродного состава и имеют лишь небольшие включения аморфного углерода. Мы предполагаем, что применение резазуринового теста может обеспечивать релевантные результаты для угольно-породных частиц с преобладающей минеральной фракцией.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-05-50114.

Список литературы

1. Lavogina D. et al. Revisiting the Resazurin-Based Sensing of Cellular Viability: Widening the Application Horizon // *Biosensors*. 2022. Vol. 12, № 4. P. 196.
2. Al-Nasiry S. et al. The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells // *Human Reproduction*. 2007. Vol. 22, № 5. P. 1304–1309.
3. Sharma N. et al. Evaluation of Anticancer activity of Silver Nanoparticles on the A549 Human Lung Carcinoma Cell Lines through Alamar Blue Assay // *BIO-PROTOCOL*. 2019. Vol. 9, № 1.
4. Kononenko V., Drobne D. In Vitro Cytotoxicity Evaluation of the Magnéli Phase Titanium Suboxides (Ti_xO_{2x-1}) on A549 Human Lung Cells // *IJMS*. 2019. Vol. 20, № 1. P. 196.

Using the resazurin test to assess the survival of MRC-5 cells exposed to coal-rock dust particles

O.S. Yakovenko*, E.D. Vdovina*, A.S. Zverev*, A.V. Larionov*

* Kemerovo State University, Kemerovo, Russia

Abstract

Objective: to evaluate the applicability of the method of fluorescent detection of the product of mitochondrial reduction of resazurin - resarufin for assessing the viability of the culture of lung fibroblasts MRC-5 exposed to dust particles of coal-rock origin from 10 μm to 100 nm. The accumulation of the reaction product occurs linearly, which reflects the biochemical activity of cells. For each sample, equations of the form $y=ax+b$ were obtained, where the coefficient "a" is proportional to the activity and the number of living cells. At the same time, a number of carbon products can distort the results.

Keywords: resazurin, rezarufin, alamarBlue dye, coal-rock particles, PM10, MRC-5.

References

1. Lavogina D. et al. Revisiting the Resazurin-Based Sensing of Cellular Viability: Widening the Application Horizon // *Biosensors*. 2022. Vol. 12, № 4. P. 196.
2. Al-Nasiry S. et al. The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells // *Human Reproduction*. 2007. Vol. 22, № 5. P. 1304–1309.
3. Sharma N. et al. Evaluation of Anticancer activity of Silver Nanoparticles on the A549 Human Lung Carcinoma Cell Lines through Alamar Blue Assay // *BIO-PROTOCOL*. 2019. Vol. 9, № 1.
4. Kononenko V., Drobne D. In Vitro Cytotoxicity Evaluation of the Magnéli Phase Titanium Suboxides (Ti_xO_{2x-1}) on A549 Human Lung Cells // *IJMS*. 2019. Vol. 20, № 1. P. 196.