

## ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ТОКСИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ НА КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ КРЫСЫ И ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА

Арабей С.В., Павлов К.И.\*, Гиндюк А.В.

*Белорусский государственный медицинский университет,  
кафедра гигиены труда, г. Минск*

*\*Лаборатория экспериментальной медицины, фармакологии и токсикологии  
научно-исследовательской части Белорусского государственного медицинского  
университета, г. Минск*

**Ключевые слова:** *in vitro-токсикология, мононуклеарные лейкоциты, фибробласты, флуоресцентные красители.*

**Резюме:** *в процессе исследования была выполнена серия опытов по оценке эффекта действия референсных токсикантов и лекарственных средств и их влияния на морфологию мононуклеарных лейкоцитов крысы и фибробластов человека. Оценивалось воздействие токсиканта на состояние и функции цитоплазматической мембраны, цитоплазмы, ядра, хроматина, митохондрий и мембранного электрохимического потенциала, цитоскелета, эндоплазматической сети, лизосом, пролиферативной активности клеток.*

**Resume:** *in the course of the study, a series of experiments was performed to assess the effect of reference toxicants and drugs and the effect on morphologists of rat mononuclear leukocytes and human fibroblasts. The effect of the toxicant on the state and function of the cytoplasmic membrane, cytoplasm, nucleus, chromatin, mitochondria and membrane electrochemical potential, cytoskeleton, endoplasmic reticulum, lysosomes, and cell proliferative activity was assessed.*

**Актуальность.** Применение методов и подходов *in vitro*-токсикологии для исследования токсических эффектов лекарственных средств является актуальной и перспективной задачей. Данные исследования по количеству и объёму в настоящее время уступают испытаниям химических токсикантов, значимых для санитарно-гигиенического контроля и нормирования. В научно-методической литературе представлены данные о токсических эффектах референсных токсикантов – веществ со стандартным, подробно изученным воздействием на культуры клеток, в частности описание культивации клеток с солями тяжёлых металлов и одноатомных спиртов [1]. Из методической литературы по гистохимии и проточной цитометрии известны эффекты сапонины, формальдегида, параформальдегида, что свидетельствует о возможности использования *in vitro*-токсикологии и для гигиенического нормирования [2].

Исследования токсических эффектов лекарственных средств необходимы для разработки методов доклинических исследований лекарственных средств, не требующих применения лабораторных животных, а также информативны для характеристики фармакологического эффекта. Культивируя клеточные культуры с лекарственными средствами, можно оценить токсическое воздействие и фармакологический эффект на субклеточном и молекулярно-генетическом уровнях. Отдельный интерес представляют культуры клеток для оценки генотоксичности лекарственных средств [3], а на стадии разработки нового препарата может использоваться панель культур клеток и фиксированный набор генов для оценки и стандартизации способа действия.

**Цель:** оценить токсическое действие ряда лекарственных средств на культуры клеток мононуклеарных лейкоцитов крысы и фибробластов человека.

**Задачи:**

1. Оценить патоморфологическое воздействие лекарственных средств на культуры клеток мононуклеарных лейкоцитов крысы и фибробластов человека.
2. Выявить изменения в морфологии клеток и состояние их структурных компонентов после воздействия лекарственных средств и референсных токсикантов.

**Материал и методы.** В процессе исследования была выполнена серия опытов по оценке эффекта действия токсикантов и их влияния на морфологию мононуклеарных лейкоцитов крысы и фибробластов человека. Оценивалось воздействие токсиканта на состояние и функции цитоплазматической мембраны, цитоплазмы, ядра, хроматина, митохондрий и мембранного электрохимического потенциала, цитоскелета, эндоплазматической сети, лизосом, пролиферативной активности клеток.

Используемые методы исследования включали в себя культивирование клеток при однократном и повторном добавлении токсикантов; микроскопию с использованием флуоресцентных красителей, специфически выявляющих клеточные структуры.

Мононуклеарные лейкоциты являются эффективной и доступной моделью для оценки воздействия ксенобиотиков и учёта их токсических эффектов. Главным преимуществом использования мононуклеарных лейкоцитов является их доступность для получения [4]. Необходимые для исследования культуры клеток мононуклеарных лейкоцитов были получены из селезёнки крысы с использованием центрифугирования в градиенте урографин-фикол 1077 г/мл, а культура клеток фибробластов человека – из коллекции научной группы «Иммунология» научно-исследовательской части БГМУ.

Токсикологический эксперимент основывался на добавлении токсиканта в необходимой концентрации к клеткам в 12-луночный планшет с последующей инкубацией при температуре 37 °С и добавлением красителя для микроскопии.

Токсикант с культурой клеток селезёнки крысы инкубировался 1 час. Краткосрочность инкубации токсиканта с культурой клеток селезёнки крысы вызвана высокой летальностью клеток селезёнки в первые сутки после выделения. После инкубации с токсикантом добавлялся флуоресцентный краситель (акрединовый желтый, родамин 6Ж, DAPI, пропидия йодид, Aktin red 555) и проводилось исследование при помощи микроскопа ZEISS Axio Vert.A1. При подсчёте изменённых клеток морфологически значимым принимался признак, проявляющийся в >90% клеток.

**Результаты и их обсуждение.** В результате воздействия токсикантов на культуры клеток мононуклеарных лейкоцитов крысы установлено, что наиболее информативные токсические эффекты наблюдались при нарушении проницаемости и целостности цитоплазматической мембраны. Данные процессы приводили к внутриклеточному проникновению красителей пропидия йодида и DAPI в мёртвые клетки. Однако при этом антибактериальные лекарственные средства оказывали дифференцированное воздействие на проницаемость цитоплазматической мембраны. Так, меропенем, ванкомицин и тейкопланин даже в низких концентрациях оказывали выраженный токсический эффект на мононуклеарные лейкоциты, сходный с референсными токсикантами (сапонином, одноатомными спиртами), в то время как цефалоспорины

(цефазолин, цефтриаксон) и колистин в концентрациях 5-50 мг/мл не выявляли нарушения клеточной целостности (таблица 1).

Таблица 1 – Оценка воздействия референсных токсикантов и лекарственных средств на целостность и функционирование цитоплазматической мембраны, ядра и хроматина мононуклеарных лейкоцитов

Токсическое воздействие	Концентрация токсиканта	Цитоплазматическая мембрана				Ядро и хроматин			
		Флуоресцентные красители							
		АЖ	Родамин 6Ж	DAPI	PI	АЖ	Родамин 6Ж	DAPI	PI
Отсутствие воздействия	-	НЭ	НЭ	НЭ	НЭ	НЭ	НЭ	НЭ	НЭ
Естественная клеточная гибель	-	НЭ	НЭ	Н/П	Н/П	Ф/Х	Ф/Х	Ф/Х	Ф/Х
ДМСО	10-30 мг/мл	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Ф/Х	Ф/Х	Ф/Х	Ф/Х
Этанол	20-50 мг/мл	НЭ	НЭ	Н/П	Н/П	Ф/Х	Ф/Х	Ф/Х	Ф/Х
Изопропанол	5-10 мг/мл	Н/Ц	Н/Ц	Н/Ц	Н/Ц	Ф/Х	Ф/Х	Ф/Х	Ф/Х
Сапонин	1-2 мг/мл	НЭ	НЭ	Н/П	Н/П	Ф/Х	Ф/Х	Ф/Х	Ф/Х
Кадмий серно-кислый	1-2 мг/мл	Н/Ц	Н/Ц	Н/Ц	Н/Ц	Ф/Х	Ф/Х	Ф/Х	Ф/Х
Марганец серно-кислый	1-2 мг/мл	Н/Ц	Н/Ц	Н/Ц	Н/Ц	Ф/Х	Ф/Х	Ф/Х	Ф/Х
Цинк уксусно-кислый	1-2 мг/мл	Н/Ц	Н/Ц	Н/Ц	Н/Ц	Ф/Х	Ф/Х	Ф/Х	Ф/Х
Ванкомицин	5-50 мг/мл	НЭ	НЭ	Н/П	Н/П	НЭ	НЭ	НЭ	НЭ
Колистин	5-50 мг/мл	НЭ	НЭ	НЭ	НЭ	НЭ	НЭ	НЭ	НЭ
Тейкопланин	5-50 мг/мл	Н/Ц	Н/Ц	Н/Ц	Н/Ц	НЭ	НЭ	НЭ	НЭ
Меропенем	5-50 мг/мл	НЭ	НЭ	Н/П	Н/П	НЭ	НЭ	НЭ	НЭ
Цефазолин	5-50 мг/мл	НЭ	НЭ	НЭ	НЭ	НЭ	НЭ	НЭ	НЭ
Цефтриаксон	5-50 мг/мл	НЭ	НЭ	НЭ	НЭ	НЭ	НЭ	НЭ	НЭ

**Примечание** - АЖ – акридиновый желтый; PI – пропидия йодид; НЭ – отсутствие эффекта; Н/П – нарушение проницаемости цитоплазматической мембраны; Н/Ц - нарушение целостности цитоплазматической мембраны; Ф/Х – фрагментация хроматина клеток

При воздействии референсных токсикантов на культуры мононуклеарных лейкоцитов характерным и наиболее показательным признаком их действия являлась фрагментация хроматина. Данное явление обнаруживалось как с помощью красителей, специфически комплементарных к ДНК (DAPI, пропидия йодид), так и для красителей, тотально окрашивающих все внутриклеточные структуры (акридиновый жёлтый, родамин 6Ж), но следует отметить отсутствие воздействия антибактериальных лекарственных средств на морфологию ядра и хроматина мононуклеарных лейкоцитов.

Характерным является также токсический эффект диметилсульфоксида, связанный с интенсивным набуханием клеток, которое сопровождалось просветлением цитоплазмы и повышением степени выраженности зернистости.

При окрашивании мононуклеарных лейкоцитов флуоресцентным красителем, предназначенным для обнаружения внутриклеточного актина (Aktin red 555), отчетливо выявлялись структуры цитоскелета, равномерно расположенные по всей клетке. А при использовании флуоресцентного красителя, предназначенного для оценки потенциала на мембране митохондрий (JC-mito), не было выявлено характерных и высокоинформативных признаков, связанных с воздействием токсикантов, что связано с малым объемом цитоплазмы в мононуклеарных клетках. Тем не менее, при сравнении информативности исследования цитоскелета и митохондрий, следует отметить, что, несмотря на малый объем цитоплазмы в мононуклеарных лейкоцитах, структуры цитоскелета, содержащие актин обнаруживаются намного нагляднее, чем митохондрии.

В экспериментах с культурами клеток фибробластов человека наряду с референсными токсикантами и антибактериальными лекарственными средствами использовались и противоопухолевые.

Для референсных токсикантов и противоопухолевых лекарственных средств (гемцитабин, меркаптопурин) наблюдалось выраженное воздействие на культуры фибробластов, сопровождающееся нарушением морфологии, проницаемости и, в конечном итоге, целостности клеток. И напротив, антибактериальные лекарственные средства в концентрациях 5-50 мг/мл не оказывали настолько интенсивного эффекта.

Культура фибробластов в норме характеризовалась разнообразной морфологией клеток. При окрашивании фибробластов акридиновым желтым наблюдалась типичная морфология клеток: веретеновидная форма, овальное ядро, базофильная цитоплазма.

Наблюдаемые в результате воздействия референсных токсикантов и противоопухолевых лекарственных средств повреждения цитоплазмы, характеризовались нарушением целостности и плотности, зернистостью, образованием вакуолей и везикул. Так, при окрашивании клеток бромистым этидием было отмечено наличие зон лизиса клеток. При использовании пиронина Б наблюдалось появление не только зон лизиса фибробластов, но и образование везикул и вакуолей.

При оценке фрагментации хроматина установлено, что она также была характерна для референсных токсикантов и противоопухолевых лекарственных средств. У фибробластов, на которых не воздействовали токсикантом, наблюдалась нормальная морфология ядра: овальная форма, равномерно расположенный хроматин и ядрышки, в то время как у обработанных токсикантом и окрашенных пропидием йодидом фибробластов происходили деструктивные изменения: нарушение целостности ядер, фрагментация хроматина и высвобождение ядрышек.

Окрашивание фибробластов человека флуоресцентным красителем, предназначенным для обнаружения внутриклеточного актина (Aktin red 555), выявило действие ряда токсикантов на плотность актиновых волокон и стабильность структуры клеток. При воздействии данных токсикантов наблюдалось выраженное снижение содержания внутриклеточного актина.

Что же касается повреждений митохондрий, то при использовании флуоресцентного красителя, предназначенного для оценки потенциала на мембране митохондрий (JC-mito), не выявлено характерных и высокоинформативных признаков, связанных с воздействием токсикантов.

## **Выводы:**

1. Проведенные в ходе исследования эксперименты позволили выделить основные токсические эффекты лекарственных средств на культуры клеток, наиболее информативные из которых определялись при нарушении проницаемости и целостности цитоплазматической мембраны, что способствовало внутриклеточному проникновению красителей пропидия йодида и DAPI в мёртвые клетки.

2. Антибактериальные лекарственные средства ванкомицин, тейкопланин и меропенем отличались повышенным гематотоксическим эффектом в сравнении с колистином, цефазолином и цефтриаксоном. Токсический эффект характеризовался нарушением целостности и проницаемости цитоплазматической мембраны мононуклеарных лейкоцитов.

3. Структуры цитоскелета фибробластов, состоящие из актиновых волокон, являются информативным объектом для наблюдения токсического эффекта референсных токсикантов. В частности, воздействие этанола характеризуется снижением плотности актиновых волокон.

В заключение, следует указать, что оцененный качественный эффект токсического воздействия лекарственных средств и референсных токсикантов на культуры мононуклеарных лейкоцитов и фибробластов является необходимым для дальнейшей разработки метода изучения общетоксического действия химических веществ с использованием альтернативной *in vitro* – токсикологии. Обнаружение ранее неизвестных токсических проявлений позволит вносить рекомендации в схемы клинических исследований и терапевтического назначения лекарственных средств. Гематотоксические проявления, характерные для малых концентраций антибиотиков, требуют внимания и дальнейшего изучения в аспекте безопасности обращения с лекарственными субстанциями при производстве.

## **Литература**

1. Дроздова, Е. В. Оценка интегральной токсичности факторов и объектов среды обитания с использованием альтернативных биологических тест-моделей: методология и технологии / Е. В. Дроздова, Н. В. Дудчик [и др.]; М-во здравоохранения Респ. Беларусь, Респ. унитар. предприятие «Науч.-практ. центр гигиены». – Минск : Транстехника, 2017. – 212 с.

2. Дудчик, Н. В. Альтернативные биологические тест-модели в оценке риска воздействия факторов среды обитания / Н. В. Дудчик, Е. В. Дроздова, С. И. Сычик; М-во здравоохранения Республики Беларусь; Науч.-практ. Центр гигиены. – Минск : Транстехника, 2015. – 195 с.

3. Image analysis of mechanistic protein biomarkers for the characterization of genotoxicants: Aneugens, clastogens, and reactive oxygen species inducers / S. Wilde, N. Queisser, A. Sutter // *Environ Mol. Mutagen.* – 2020. – P. 1-17.

4. Павлов, К. И. Мононуклеарные лейкоциты периферической крови как объект для исследования метаболизма этанола / К. И. Павлов, А. В. Копытов, Л. П. Титов // *Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы (к 50-летию ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»): материалы II Международной научной конференции, Минск, 13–16 октября 2015 г.* / редкол. А. В. Кильчевский [и др.]; Институт генетики и цитологии НАН Беларуси. – Минск, 2015. – 238 с.