

ТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ЭТАНОЛА НА КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК

Кончак В. В., Солонец К. М., Павлов К. И.

*Белорусский государственный медицинский университет,
кафедра микробиологии, вирусологии, иммунологии, г. Минск*

Ключевые слова: *in vitro-токсикология, этанол, кератиноциты HaCaT. Мононуклеарные лейкоциты.*

Резюме: *оценка токсического эффекта этанола для культур клеток позволила оценить токсический эффект различных концентраций при краткосрочном и долгосрочном воздействии.*

Resume: *evaluation of the toxic effect of ethanol for cell cultures made it possible to evaluate the toxic effect of various concentrations upon short-term and long-term exposure.*

Актуальность. Этанол — вещество, сочетающее в себе свойства естественного метаболита организма человека (в малых концентрациях), токсичного ксенобиотика, медицинского препарата и алиментарного фактора, который способен существенно изменять эффективность фармакотерапии [1].

Этиловый спирт оказывает токсический эффект на ряд органов человека. Смертность, связанная с употреблением алкоголя, составляет, по данным ВОЗ, 6,3 % у мужчин и 1,1 % у женщин [2].

В настоящее время для исследований токсикологических эффектов в качестве альтернативы традиционным экспериментам на живых животных предлагают использовать методы и подходы альтернативной *in vitro*-токсикологии.

Альтернативная *in vitro*-токсикология – перспективное и динамично развивающееся направление тестирования химических веществ. Тест-объектом в *in vitro*-токсикологии являются культуры клеток и тканей, микроорганизмы, мелкие ракообразные. В Республике Беларусь объёмные исследования в области альтернативной *in vitro*-токсикологии выполнялись с целью санитарно-гигиенической оценки токсичности антропогенных химических факторов [3]. В этой области накоплен массив экспериментальных данных, разработаны методы, выполнены внедрения [4]. Несмотря на высокую потребность, аналогичные исследования для оценки токсичности лекарственных средств выполняются в значительно меньшем количестве. Её преимуществами являются возможность использования широкого спектра тест-моделей и моделирования органо- и тканеспецифических эффектов; серийность тестов, позволяющая одномоментно использовать широкий спектр доз и токсикантов; большая эффективность таких исследований за счет сокращения временных и экономических затрат; гуманность данных исследований [5].

Цель: оценка токсического действия этанола на культуры клеток мононуклеарных лейкоцитов и кератиноцитов HaCaT с использованием методов и подходов альтернативной *in vitro*-токсикологии.

Задачи: 1. Инкубация клеточных культур в растворах этанола различной концентрации; 2. Световая и флуоресцентная микроскопия с последующей графической обработкой полученных изображений; 3. Математическая и

статистическая обработка результатов с построением кривых зависимости «концентрация – эффект».

Материал и методы. Материалом для исследования послужили культуры кератиноцитов HaCaT и мононуклеарных лейкоцитов крысы.

Клетки линии HaCaT являются иммортализованными кератиноцитами взрослого человека [6,7]. Иммортализация достигается после мутаций в обеих аллелях гена-супрессора опухолей p53 после длительного культивирования. Также на данный процесс оказывает влияние сниженная концентрации кальция в среде и повышенная температура культивации. Культура HaCaT является высокодифференцированной линией, экспрессирующей основные факторы кератиноцитов (кератины, инволукрин, филагрин). Культура HaCaT относительно неприхотлива и удобна для стандартных условий культивации [7].

Культуры клеток и кератиноцитов HaCaT были получены в научной группе «Иммунология» Научно-исследовательской части БГМУ. Перед исследованием клетки культивировались в течение 3-х суток в среде DMEM с добавлением L-глутамина и сыворотки эмбрионов телят до достижения необходимого количества в 600 тысяч клеток для кератиноцитов HaCaT и 1 млн для фибробластов человека на 1 лунку 24-х луночного планшета.

Мононуклеарные лейкоциты – это эффективная модель для оценки воздействия ксенобиотиков и учёта их токсических эффектов. У лабораторных животных дополнительным источником большого количества мононуклеарных лейкоцитов является селезёнка. Паренхима селезёнки представлена различными типами лимфоцитов (Т- и В-лимфоциты, НК-клетки) и моноцитами. Большинство Т- и В-клеток селезенки являются частью рециркулирующего пула лимфоцитов, которые непрерывно мигрируют по всем вторичным лимфоидным органам, а также движутся по другим тканям. Токсические эффекты в отношении селезёнки крайне редко выделяются как отдельный параметр побочного действия. В то же время, при доклиническом исследовании лекарственных средств, именно селезёнка и лимфоциты периферической крови часто демонстрируют изменения. Культура мононуклеарных лейкоцитов получена в лаборатории экспериментальной медицины, фармакологии и токсикологии НИЧ БГМУ путем центрифугирования измельченной селезенки крыс Wistar в градиенте урографин-фиколл с последующим разбавлением до количества в 10 млн клеток на 1 лунку 24-луночного планшета.

Инкубация культуры мононуклеарных лейкоцитов проводилась в течение 1 часа. Инкубация суспензии клеток кератиноцитов HaCaT проводилась в течение 24 часов. Краткосрочность инкубации мононуклеарных лейкоцитов связана с высокой летальностью культуры в первые сутки после выделения. Световая и флуоресцентная микроскопия осуществлялась при помощи микроскопа ZEISS Axio Vert.A1. с использованием красителей пропидия йодида, акридинового жёлтого, бромистого этидия. Выполнялся положительный (сапонин 0,02 мг/мл) и отрицательный (дистиллированная вода) контроль.

В основу оценки иммунотоксичности было положено свойство красителя пропидия йодида связываться с ДНК, что возможно только в мертвой клетке в результате нарушения барьерной функции цитолеммы и кариолеммы. Клетки,

активно инкорпорирующие пропидий йодид, ярко окрашенные при флуоресцентной микроскопии, принимались за мертвые.

Оценку активности токсикантов осуществляли с помощью пробит-анализа – вычислены летальные концентрации (LC16, LC50, LC84, LC100) . Величины доз, характеризующих минимальный эффект гибели (пороговая концентрация – LC10), вызывающих летальный эффект у большинства клеток (LC90), и минимальной абсолютно летальной концентрации (LC99). Кроме того, вычисляли коэффициенты, характеризующие степень токсичности: индекс летальности (ИЛ), как отношение LC99 к LC10, и коэффициент наклона прямой «доза – эффект» (КН).

Для оценки токсичности различных концентраций этанола в графическом редакторе Adobe Photoshop CC были совмещены микрофотографии, полученные при флуоресцентной микроскопии, с микрофотографиями, полученными при световой микроскопии. Для обработки результатов использовались табличный процессор Microsoft Excel 2016 и пакет программного обеспечения Statsoft Statistica 10.

Результаты и их обсуждение. Культура кератиноцитов HaCaT характеризовалась однородностью клеточного состава и возможностью лёгкого подсчёта клеток. Минимальный объём положительного контроля (сапонин 0,02 мг/мл) приводил к 100% гибели клеток культуры.

После инкубации культуры кератиноцитов HaCaT в течение 24 часов отмечалось округление и уменьшение клеток (рисунок 1).

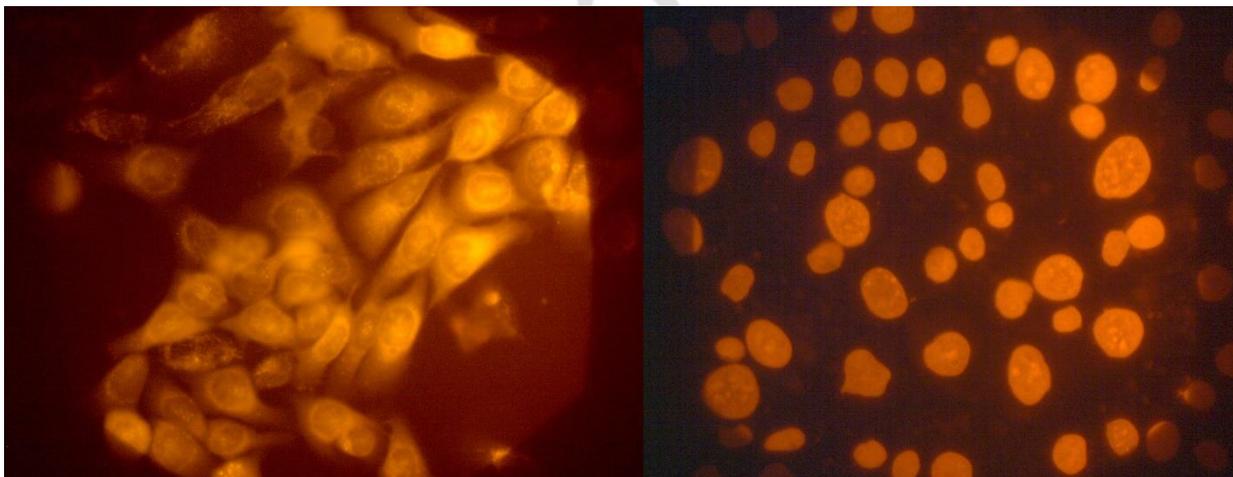


Рис. 1 – Изменение морфологии кератиноцитов HaCaT: а) норма; б) при воздействии 5%-ного раствора этилового спирта

Диапазон токсических концентраций для этанола LC₁₆ - LC₈₄ находился на уровне 22,6 – 74,5 мг на 1 мл среды, в которой находилось не менее 600 тыс. кератиноцитов. Это соответствовало 2% - 9% растворам этанола в культуральной среде (рисунок 2).

Наращение гибели клеток не характеризовалось линейным ростом зависимости от концентрации, а было связано с резким повышением летальности при достижении концентрации 62 мг/мл (8%).

Токсический эффект этилового спирта в отношении культуры клеток селезёнки крысы (некроз клеток в культуре) проявлялся при краткосрочной

инкубации (1 час) (таблица 3). Интенсивное повышение гибели клеток наблюдалось между концентрациями 11,7-15,8 мг/мл (рисунок 3).

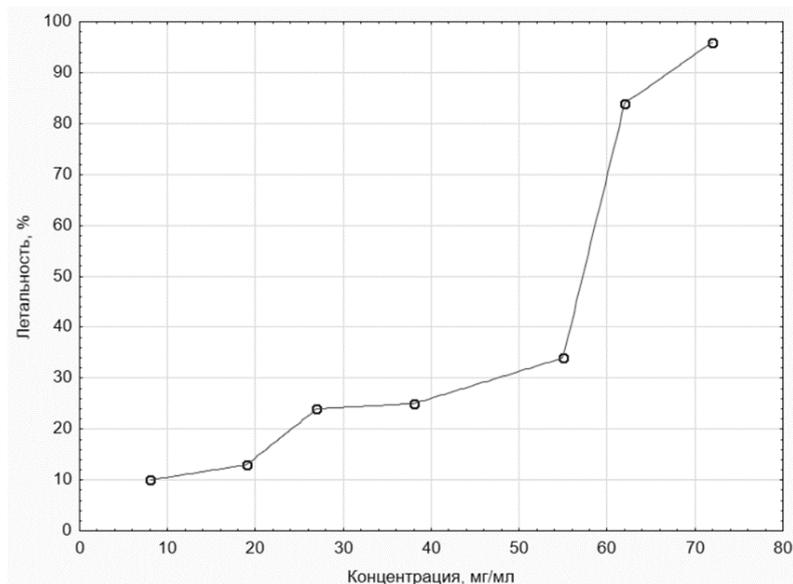


Рис. 2 – Зависимость летальности кератиноцитов NaCaT от концентрации этанола в растворе

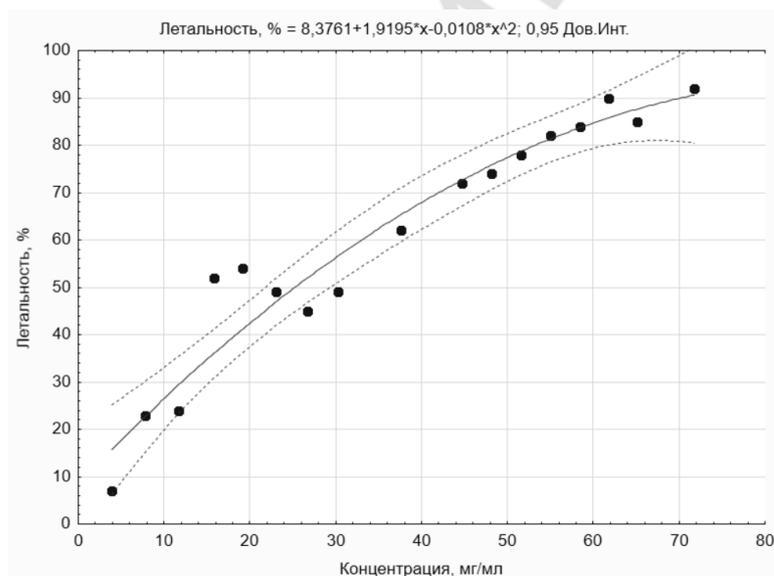


Рис. 3 – График зависимости «концентрация – эффект» этилового спирта для культуры мононуклеарных лейкоцитов крысы

Токсический эффект в отношении различных культур имел некоторые отличия, что связано как с морфофункциональными различиями клеток используемых культур, так и с особенностями постановки опытов (таблица 1).

Табл. 1 – Различия в токсическом эффекте этанола на культуры клеток

Характеристика токсического эффекта	Кератиноциты NaCaT	Мононуклеарные лейкоциты
Достижение интенсивной летальности	24 часа	1 час
Диапазон LC ₁₆ - LC ₈₄	22,6 – 74,5 мг/мл (2% - 9%)	3,7 – 58,3 мг/мл (0,5% - 7,5%)

Точка роста летальности	62,0 мг/мл (8%)	15,8 мг/мл (2%)
Расчётное значение LC ₅₀	48,6 мг/мл	27,3 мг/мл
Изменение морфологии	Округление и уменьшение клеток	Нет

Выводы: 1. Использование методов и подходов альтернативной *in vitro*-токсикологии позволило оценить токсическое воздействие этанола на культуры клеток. Данные методы отличались простотой использования и наглядностью, они имеют большой экспериментальный потенциал и практическую актуальность. 2. Используемые культуры клеток являются эффективными тест-моделями для токсикологических экспериментов *in vitro*. 3. Были определены летальные концентрации LC₅₀: для культуры кератиноцитов HaCaT – 48,6 мг/мл, для культуры мононуклеарных лейкоцитов – 27,3 мг/мл, что характеризует этанол как высокотоксичное вещество.

Литература

1. Зупанец И. А., Бездетко Н. В., Деримедведь Л. В. / Национальный фармацевтический университет (Украина) / Фармацевтическая опека: клинико-фармацевтические аспекты применения алкоголя в медицине. // Журнал «Провизор» (Украина). — 2003. — № 4.
2. Rehm J, Mathers C, Povova S, Thavnorncharoensap M, Teerawattananon Y, Patra J. Global burden of disease and injury and economic cost attributable to alcohol use and alcohol-use disorders. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine // *ncbi.nlm.nih.gov* (Lancet; 2009 Jun 27).
3. Дудчик, Н. В. Тест-модель и количественный критериальный показатель для оценки антимикробного потенциала наноматериалов, используемых для водоочистки и водоподготовки: обоснование и метрологическая оценка / Н. В. Дудчик, Е. В. Дроздова, С. И. Сычик // Анализ риска здоровью. – 2018. – №3. – С. 104-111.
4. Власенко, Е. К. Особенности токсического действия гексилового эфира 5-аминолевулиновой кислоты и обоснование регламентов его безопасного производства и применения / Е. К. Власенко // Анализ риска здоровью. – 2017. – №3. – С. 118-126.
5. Кончак, В. В., Сравнительная оценка иммунотоксического эффекта лекарственного средства цефазолин с использованием культур клеток / В. В. Кончак, К. М. Солонец, Н. А. Волчек // Студенческая медицинская наука XXI века. IV Форум молодежных научных обществ : материалы XIX междунар. науч.-практ. кон. студентов и молодых ученых и IV Форума молодеж. науч. обществ (Витебск, 23 -24 октября 2019 г.) / под ред. А. Т. Щастного. – Витебск: ВГМУ, 2019. – С. 97-100.
6. Rekus, M. T. Characterization of growth and differentiation of a spontaneously immortalized keratinocyte cell line (HaCaT) in a defined, serum-free culture system / Martin T Rekus – Düsseldorf: Univ.Diss, 2000. – 81 p.
7. Micallef, L. Effects of extracellular calcium on the growth-differentiation switch in immortalized keratinocyte HaCaT cells compared with normal human keratinocytes / L. Micallef // Experimental Dermatology. – 2009. – № 18. – P. 143–151.