

Токсическое действие лекарственных средств на культуры клеток в исследованиях *in vitro*

Павлов К. И., Арабей С. В., Кундельская Л. М., Курклинская Г. А., Наборовская А. М.,
Хватова Л. А., Метелица Т. Г., Чегодаева Е. В., Гиндюк А. В.

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Республика Беларусь

Реферат. В ходе исследования выполнены серии экспериментов по оценке токсических эффектов, возникающих вследствие воздействия лекарственных средств и химических веществ — референсных токсикантов на культуры клеток иммортализованных кератиноцитов HaCaT, фибробластов человека, мезенхимальных стволовых клеток мыши и мононуклеарных лейкоцитов крысы. Исследуемые лекарственные средства являлись представителями разных групп с различным механизмом действия (антибактериальные, противовирусные, противоопухолевые, противовоспалительные, анальгетики, иммунобиологические препараты, сердечные гликозиды). Установлена высокая информативность одновременного использования комбинации флуоресцентных красителей (акридиновый желтый, DAPI, Actin red) для обнаружения основных цитотоксических эффектов.

Ключевые слова: *in vitro*-токсикология, мононуклеарные лейкоциты, кератиноциты HaCaT, фибробласты, лекарственные средства.

Введение. Использование альтернатив испытаниям на животных приобретает все большее значение при оценке безопасности химических веществ. В настоящее время для этих целей используются различные клеточные модели, такие как линии клеток человека (например, HepG2, HepaRG), свежeweделенные гепатоциты, совместные культуры, трехмерные модели и модели ткани и органа на чипе [1].

Традиционные лабораторные исследования на животных постепенно рассматриваются как неподходящий подход для оценки токсичности из-за того, что данные исследования являются дорогостоящими, трудоемкими и считаются неэтичными. На основе этих соображений развиваются новые технологии, в которых анализы *in vitro* играют важную роль в характеристике токсичности химических веществ [2].

Оценка воздействия химических веществ включает в себя качественное описание токсических свойств, а также количественную оценку воздействия и токсической реакции. Токсикокинетическая оценка помогает связать концентрацию/дозу химического вещества с наблюдаемым эффектом токсичности и понять механизм действия химического вещества и/или его метаболитов. Понимание токсикокинетических процессов, которые приводят к образованию или распределению активного химического соединения в целевой ткани, необходимо для оценки дозы в токсикологическом целевом участке [3].



Основными признаками для оценки воздействия лекарственных средств на культуры клеток являются прямая цитотоксичность и проапоптотический эффект. Гистохимическими маркерами в таких исследованиях являются конденсация хроматина, фрагментация ДНК, снижение мембранного потенциала митохондрий [4]. Данные исследования особенно актуальны для моделирования гепатотоксичности *in vitro*.

Определение токсических эффектов лекарственных средств является необходимым условием для разработки методов их доклинических исследований. Культивация клеточных культур с лекарственными средствами позволяет провести оценку токсического воздействия и фармакологических эффектов на субклеточном и молекулярно-генетическом уровнях.

Цель работы — оценка токсического действия лекарственных средств в исследованиях *in vitro* с использованием клеточной линии кератиноцитов и первичных культур моноклеарных лейкоцитов.

Материалы и методы. Материалом для исследования послужили культуры иммortalизованных кератиноцитов HaCaT, фибробластов человека, мезенхимальных стволовых клеток (МСК) мыши и моноклеарных лейкоцитов крысы.

Культура клеток кератиноцитов HaCaT и фибробластов были получены в коллекции научной группы «Иммунология» научно-исследовательской части БГМУ. Моноклеарные лейкоциты были получены из селезенки крысы с использованием центрифугирования в градиенте урографин-фикол 1077 г/мл. МСК получены из костного мозга мыши. Морфология и фенотип полученных клеток соответствовали требованиям, предъявляемым к МСК (CD90⁺CD45^{lo/-}).

Перед исследованием фибробласты и МСК культивировались в течение 3 суток в среде DMEM с добавлением L-глутамина и сыворотки эмбрионов телят до достижения количества в 600 тыс. клеток на одну лунку 24-луночного планшета. Моноклеарные лейкоциты из селезенки крысы использовались в токсикологических исследованиях сразу после приготовления суспензии.

Клетки линии HaCaT культивировали в среде F12/DMEM с добавлением 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone, США), 4,5 мг/мл глутамина, 50 ЕД/мл пенициллина, при 37 °С в 5%-й атмосфере.

Токсикант с культурой клеток селезенки крысы инкубировался в течение одного часа, а с культурой клеток кератиноцитов HaCaT — 24 ч. Краткосрочность инкубации токсиканта с культурой клеток селезенки крысы вызвана высокой летальностью клеток селезенки в первые сутки после выделения.

Выбор лекарственных средств в качестве токсиканта осуществлялся с использованием справочников и электронных баз данных с целью отразить наиболее значимые классы, представленные в ассортименте лекарств Республики Беларусь. Как для порошков, так и для лекарственных средств в форме таблеток и капсул ставилась цель равномерности присутствия лекарственной субстанции при приготовлении раствора токсиканта для культивации с клетками. В качестве референсных токсикантов с предсказуемым эффектом использовались химические вещества (сапонин, этанол, изопропанол, метанол, цинк уксуснокислый 2-водный, кадмий сернокислый 8-водный и др.).

По окончании инкубации проводилась световая и флуоресцентная микроскопия при помощи микроскопа ZEISS Axio Vert.A1 с использованием флуоресцентных красителей (акрединный желтый, родамин 6Ж, DAPI, пропидия йодид, Aktin red 555 и др.), специфически выявляющих клеточные структуры. Полученные микрофотографии обрабатывались и совмещались в графическом редакторе с последующим определением соотношения мертвых и живых клеток в зависимости от концентрации вещества и построением кривой концентрация—эффект.

Результаты и их обсуждение. Используемая в данном исследовании культура иммortalизированных кератиноцитов HaCaT является достаточно полно изученной в вопросах сравнительного метаболизма. Культура HaCaT является высокодифференцированной линией, экспрессирующей основные факторы кератиноцитов (кератины, инволукрин, филагрин), а также удобна для стандартных условий культивации. При этом в сравнении с нормальными кератиноцитами выявлены как сходства, так и различия. Сходные признаки относятся к базовым процессам клеточного метаболизма, различия — к особенностям иммунологической реактивности. Для исследований токсикантов *in vitro* наиболее значимыми являются первые характеристики. Следует отметить, что культура кератиноцитов HaCaT используется как для моделирования метаболизма нормальных кератиноцитов, так и для изучения иммуновоспалительных реакций.

Эффективной и доступной моделью для оценки воздействия ксенобиотиков и учета их токсических эффектов явилась культура клеток мононуклеарных лейкоцитов. Лимфоциты и моноциты обладают широким спектром экспрессирующихся генов. У лабораторных животных дополнительным источником большого количества мононуклеарных лейкоцитов является селезенка, которая относится к периферическим органам иммунной системы. Строма состоит из ретикулярных клеток и ретикулярных волокон, паренхима селезенки представлена различными типами лимфоцитов, НК-клетками и моноцитами. Большинство Т- и В-клеток селезенки являются частью циркулирующего пула лимфоцитов. Токсические эффекты в отношении селезенки крайне редко выделяются как отдельный параметр побочного действия. В то же время при доклиническом исследовании лекарственных средств, именно селезенка и лимфоциты периферической крови часто демонстрируют изменения.

Проведенные в ходе исследования эксперименты позволили выделить основные и наиболее важные токсические эффекты лекарственных средств на культуры клеток, к которым относятся изменение размеров клетки, нарушение морфологии и проницаемости, нарушение целостности цитоплазматической мембраны, фрагментация хроматина (таблица 1).

Таблица 1 — Оцениваемые параметры токсического воздействия на культуры клеток

Морфологическая характеристика	Используемые красители
Нет эффекта: отсутствие патологических изменений, морфология соответствует нормальному состоянию клеточной культуры	Акридиновый желтый, трипофлавин, родамин 6Ж, пропидий йодид, DAPI, пиронин Б, пиронин С, hoechst 33258
Нарушение проницаемости цитоплазматической мембраны	Пропидий йодид, DAPI, бромистый этидий, трипофлавин
Нарушение целостности цитоплазматической мембраны	Акридиновый желтый, трипофлавин, родамин 6Ж, пропидий йодид, DAPI, пиронин Б, пиронин С, hoechst 33258
Фрагментация хроматина	Пропидий йодид, DAPI
Нарушение морфологии клетки — округление	Акридиновый желтый, трипофлавин, родамин 6Ж, hoechst 33258
Повреждение актиновых структур цитоскелета	Aktin red
Снижение электрохимического заряда на мембране митохондрий	JC-Mito
Краситель не эффективен	Пропидий йодид, JC-Mito, Aktin red

В результате оценки характера повреждения структурных компонентов клетки выявлены следующие эффекты при воздействии токсикантов на цитоплазматическую мембрану клеток:

- наличие дифференцированных эффектов при воздействии антибактериальных лекарственных средств на цитоплазматическую мембрану культуры клеток мононуклеарных лейкоцитов крысы (выраженный токсический эффект при воздействии меропенема, ванкомицина, тейкопланина и доксирубицина и отсутствие повреждения клеток при воздействии цефалоспоринов (цефазолин, цефтриаксон) и колистина в концентрациях 5–50 мг/мл);
- отсутствие эффектов при воздействии антибактериальных лекарственных средств в концентрациях 5–50 мг/мл на цитоплазматическую мембрану культуры фибробластов человека и выраженное воздействие референсных токсикантов и противоопухолевых лекарственных средств (гемцитабин, меркаптопурин, доксирубин), сопровождающееся нарушением морфологии, проницаемости и, в конечном итоге, целостности клеток;
- высокая чувствительность культур мезенхимальных стволовых клеток как к действию референсных токсикантов, так и антибактериальных лекарственных средств в отношении проницаемости и целостности цитоплазматической мембраны;
- высокая чувствительность кератиноцитов HaCaT как к действию референсных токсикантов, так и к используемым в эксперименте лекарственным средствам, что проявлялось в изменении проницаемости и целостности цитоплазматической мембраны, а также в изменении формы клеток (их округление).



Токсические эффекты действия токсикантов на ядро и хроматин сопровождались следующими проявлениями:

- фрагментация хроматина мононуклеарного лейкоцита, наблюдаемая при воздействии референсных токсикантов на культуры мононуклеарных лейкоцитов и отсутствие воздействия антибактериальных лекарственных средств на морфологию данных структур;
- фрагментация хроматина фибробласта человека при воздействии референсных токсикантов и противоопухолевых лекарственных средств (нарушение целостности ядер, высвобождение ядерышек);
- фрагментация хроматина МСК при воздействии референсных токсикантов и противоопухолевых лекарственных средств с более выраженными по сравнению с воздействием на фибробласты человека морфологическими проявлениями;
- фрагментация хроматина кератиноцитов NaCaT при воздействии этанола, изопропанола, метанола, бутанола, а также колистина, меркаптопурина, ацикловира.

Токсические эффекты на цитоскелет:

- отчетливое выявление структур цитоскелета, равномерно расположенных по всей клетке, при окрашивании мононуклеарных лейкоцитов флуоресцентным красителем, предназначенным для обнаружения внутриклеточного актина (Aktin red 555);
- воздействие ряда токсикантов на плотность актиновых волокон и стабильность структуры клеток при окрашивании фибробластов человека флуоресцентным красителем, предназначенным для обнаружения внутриклеточного актина (Aktin red 555);
- воздействие ряда токсикантов на плотность актиновых волокон и стабильность структуры клеток при окрашивании мезенхимальных стволовых клеток флуоресцентным красителем, предназначенным для обнаружения внутриклеточного актина (Aktin red 550). Инкубация с ДМСО, этанолом, изопропанолом, солями тяжелых металлов, колистином, меропенемом, тейкопланином и меркаптопурином приводила к изменению морфологии клеток в сторону их округления;
- инкубация кератиноцитов NaCaT с этанолом, изопропанолом, метанолом, бутанолом, солями тяжелых металлов, ванкомицином, колистином, тейкопланином, меропенемом, цефазолином, меркаптопурином сопровождалась изменением морфологии клеток (округлением);
- наиболее частыми изменениями в строении цитоскелета кератиноцитов, фибробластов и стволовых клеток было снижение количества актиновых волокон. В то же время для мононуклеарных лейкоцитов была характерна замена актиновых пучков точками. Для кератиноцитов наблюдалось сочетание снижения числа актиновых волокон и замена пучков точками.

Токсические эффекты на митохондрии:

- отсутствие характерных и высокоинформативных признаков, связанных с воздействием токсикантов на мононуклеарные лейкоциты и выявленное при использовании флуоресцентного красителя, предназначенного для оценки потенциала на мембране митохондрий (JC-mito), что связано с малым объемом цитоплазмы данных клетках;
- отсутствие характерных и высокоинформативных признаков, связанных с воздействием токсикантов на фибробласты человека и выявленное при использовании флуоресцентного красителя, предназначенного для оценки потенциала на мембране митохондрий (JC-mito);
- изменение мембранного потенциала мезенхимальных стволовых клеток мыши, связанное с воздействием токсикантов и выявленное при использовании флуоресцентного красителя, предназначенного для оценки потенциала на мембране митохондрий (JC-mito). Значительное сохранение мембранного потенциала для таких лекарственных средств, как колистин, меропенем, тейкопланин, меркаптопурин;
- изменение мембранного потенциала кератиноцитов NaCaT при инкубации с токсикантами, а также при воздействии антибактериальных лекарственных средств (ванкомицин, колистин, тейкопланин, меропенем).

Исследования токсикологических параметров *in vitro* на культуре кератиноцитов NaCaT позволили определить основные подходы к выбору флуоресцентных красителей, оценке токсических проявлений, статистической обработке результатов действия токсикантов (рисунок).

Установлено, что для оценки эффекта возможно использование метода наименьших квадратов с пробит-анализом — вычисление среднелетальных концентраций (LC_{16} , LC_{50} , LC_{84} , LC_{100}) исследуемого токсиканта. Дополнительно проводился анализ параметров токсичности с использованием метода Блисса — Прозоровского. Кроме того, вычисляли коэффициенты, характеризующие степень токсичности: индекс летальности (ИЛ) как отношение LC_{99} к LC_{10} и коэффициент наклона прямой «доза—эффект» (КН), указывающий на скорость нарастания токсических эффектов.

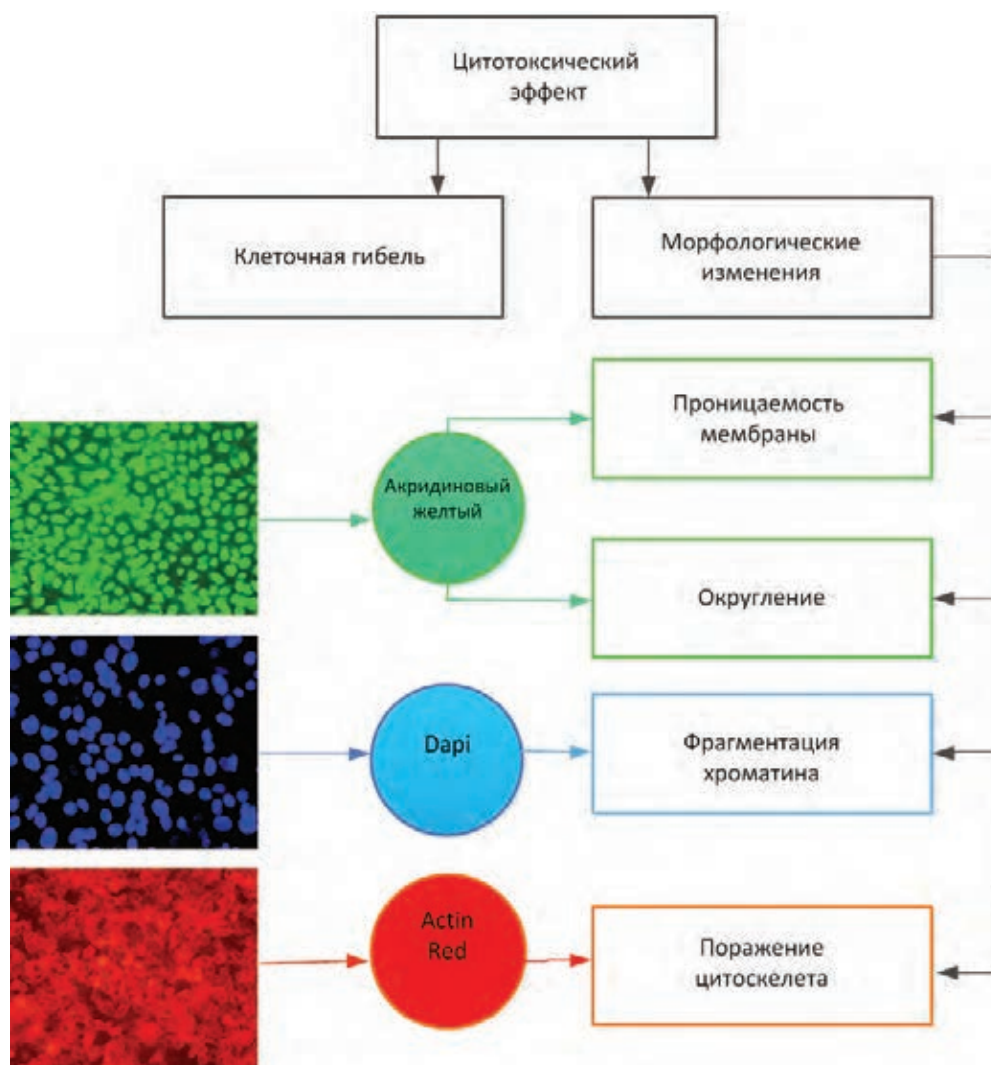


Рисунок — Методический подход по оценке токсического эффекта лекарственных средства химических веществ с помощью кератиноцитов HaCaT

Выявленные токсикологические параметры при культивировании кератиноцитов с лекарственным средством ванкомицин и колистин представлены в таблицах 2 и 3 соответственно.

Таблица 2 — Сводные показатели токсичности лекарственного средства ванкомицин для культуры клеток кератиноцитов HaCaT

Доза, мг/мл	Мертвые клетки, %	Летальная концентрация, мг/мл				КН	ИЛ
		LC ₅₀	LC ₈₄	LC ₉₀	LC ₉₉		
5	36	115,39 ± 16,33	461,71	400,07	645,59	1,98	3,19
12,5	40						
25	42						
37,5	43						
50	43						
75	45						
100	46						
150	48						
250	69						
500	100						

Таблица 3 — Сводные показатели токсичности лекарственного средства колистин для культуры клеток кератиноцитов HaCaT

Доза, мг/мл	Мертвые клетки, %	Летальная концентрация, мг/мл				КН	ИЛ
		LC ₅₀	LC ₈₄	LC ₉₀	LC ₉₉		
5	27	42,50 ± 4,19	126,26	144,46	227,66	1,43	3,81
12,5	27						
25	31						
37,5	59						
50	65						
75	77						
100	77						
150	82						
250	100						
500	100						

В таблице 4 представлены результаты сравнения показателей LD₅₀ и LC₅₀ для ряда исследованных лекарственных средств.

Таблица 4 — Сравнение графиков с процентом летальности, полученных в исследованиях *in vivo* и *in vitro*

Токсикант	LD ₅₀ , <i>in vivo</i> (крысы-самцы), мг/кг	LC ₅₀ , <i>in vitro</i> (кератиноциты HaCaT), мг/мл
Мелоксикам	64	1
Ванкомицин	385	115
Цефазолин	3501	более 160
Колистин	134	42
Меркаптопурин	392	114

Полученные данные позволяют сделать вывод о сопоставимости результатов для двух способов исследования токсического эффекта.

Заключение. Получены данные о том, что цитотоксические эффекты лекарственных средств в отношении кератиноцитов HaCaT (концентрация 5–10 мг/мл) наблюдаются через 24 ч инкубации и выражаются в достижении летальности свыше 50 %, конденсации хроматина, уменьшении количества актиновых волокон, снижении мембранного потенциала митохондрий. Выявлено, что для изученных культур клеток наиболее разнообразные токсические эффекты лекарственных средств отмечались у кератиноцитов HaCaT.

Установлено, что значительные информативные данные определялись при нарушении проницаемости и целостности цитоплазматической мембраны, что способствовало внутриклеточному проникновению красителей пропидия йодида и DAPI в мертвые клетки.

Проведенные в ходе исследования эксперименты позволяют выделить основные и наиболее важные токсические эффекты лекарственных средств на культуры клеток. Оцененный качественный эффект токсического воздействия лекарственных средств и референсных токсикантов на культуры клеток является необходимым для дальнейшей разработки метода изучения общетоксического действия химических веществ с использованием альтернативной *in vitro*-токсикологии.

Литература

1. New methods in tissue engineering: improved models for viral infection / V. Ramanan [et al.] // Annu. Rev. Virol. — 2014. — Vol. 1. — P. 475–499.
2. Workshop report: FDA workshop on improving Cardiotoxicity assessment with human — relevant platforms / L. Pang [et al.] // Circ. Res. — 2019. — Vol. 125(9). — P. 855–867.
3. Underhill, G. H. Advances in engineered human liver platforms for drug metabolism studies / G. H. Underhill, S. R. Khetani // Drug. Metab. Dispos. — 2018. — Vol. 46, № 11. — P. 1626–1637.
4. 3-dimensional bioprinting for tissueengineering applications / B. K. Gu [et al.] // Bio-materials Research. — 2016. — Vol. 20. — P. 12.



***In vitro* studies of drugs toxic effect on cell cultures**

*Pavlov K. I., Arabei S. V., Kundelskaya L. M., Kurklinskaya G. A., Naborovskaya A. M.,
Khvatova L. A., Metelitsa T. G., Chegodayeva E. V., Hindziuk A. V.*

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

In the course of the study, a series of experiments were performed to assess the toxic effects arising from the effects of drugs and chemicals — reference toxicants on the cell cultures of immortalized keratinocytes HaCaT, human fibroblasts, mouse mesenchymal stem cells and rat mononuclear leukocytes. The investigated drugs were representatives of different groups with different mechanisms of action (antibacterial, antiviral, antineoplastic, anti-inflammatory, analgesics, immunobiological drugs, cardiac glycosides). The high information content of the simultaneous use of a combination of fluorescent dyes (acridine yellow, DAPI, Actin red) for the detection of the main cytotoxic effects was established.

Keywords: *in vitro* toxicology, mononuclear leukocytes, HaCaT keratinocytes, fibroblasts, drugs.

Поступила 10.06.2021