

*В. В. Кончак, К. М. Солонец*

**ИССЛЕДОВАНИЕ ТОКСИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ И ПОДХОДОВ  
АЛЬТЕРНАТИВНОЙ IN VITRO-ТОКСИКОЛОГИИ**

*Научный руководитель: канд. мед. наук К. И. Павлов*

*Кафедра микробиологии, вирусологии, иммунологии,*

*Лаборатория экспериментальной медицины, фармакологии токсикологии НИЧ,*

*Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск*

*U. V. Kanchak, K. M. Salanets*

**STUDY OF THE TOXIC EFFECT OF CHEMICALS USING THE METHODS  
AND APPROACHES OF ALTERNATIVE IN VITRO-TOXICOLOGY**

*Tutor: K. I. Pavlov, PhD*

*Department of Microbiology, Virology, Immunology,*

*Laboratory of Experimental Medicine, Pharmacology and Toxicology*

*Belarusian State Medical University, Minsk*

**Резюме.** Разработана методика оценки токсического воздействия химических веществ с использованием методологии альтернативной in vitro-токсикологии. Получены данные о воздействии этанола и лекарственных средств мелоксикам, гемцитабин на культуры клеток.

**Ключевые слова:** альтернативная in vitro-токсикология, лекарственные средства.

**Resume.** A methodology has been developed for assessing the toxic effects of chemicals using alternative in vitro-toxicology methodology. The effects of ethanol, meloxicam, gemcitabine on cell culture are revealed.

**Keywords:** alternative in vitro-toxicology, drugs.

**Актуальность.** 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.

Преимуществами исследования токсических эффектов in vitro являются: возможность использовать в качестве тест-объектов широкий спектр культур клеток и тканей млекопитающих и человека; возможность моделировать органо- и тканетоксические эффекты; серийность данных тестов, что позволяет использовать одновременно большое количество доз и токсикантов; использование культур клеток является менее затратным; исследования на культурах клеток являются гуманными и не связаны со страданием лабораторных животных и психологическим дискомфортом у исследователя.

**Цель:** разработка методики оценки общетоксического эффекта химических веществ, в том числе лекарственных средств, с использованием методологии альтернативной in vitro-токсикологии и оценка токсического эффекта химических веществ для культур клеток с применением данной методики.

**Материал и методы.** Материалом для исследования послужили культуры кератиноцитов HaCaT, фибробластов человека и мононуклеарных лейкоцитов.

Клетки линии HaCaT являются иммортализованными кератиноцитами взрослого человека [1,2]. Культура HaCaT относительно неприхотлива и удобна для стандартных условий культивации [2].

Культуры кератиноцитов HaCaT и фибробластов человека 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.

Культура моноклассных 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 моноклассных лейкоцитов проводилась в течение 1 часа. Инкубация суспензии клеток кератиноцитов HaCaT проводилась в течение 24 часов. Краткосрочность инкубации моноклассных 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 желтого, 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 ( $LC_{16}$ ,  $LC_{50}$ ,  $LC_{84}$ ,  $LC_{100}$ ). Кроме того, вычисляли коэффициенты, характеризующие степень токсичности: ин-декс летальности (ИЛ), как отношение  $LC_{99}$  к  $LC_{10}$ , и коэффициент наклона прямой «доза – эффект» (КН).

Для обработки результатов использовались табличный процессор Microsoft Excel 2016 и пакет программного обеспечения Statsoft Statistica 10.

**Результаты и их обсуждение.** В ходе работы была разработана методика оценки общетоксического эффекта химических веществ с использованием методологии альтернативной *in vitro*-токсикологии, были получены следующие результаты:

1 В ходе токсикологических экспериментов было показано, что использованные культуры являются эффективными тест-моделями для оценки токсического эффекта, были построены кривые «концентрация – эффект» для различных токсикантов.

2 В качестве контрольного токсиканта был использован сапонин, что дополняет сведения о влиянии эталонных токсикантов на культуру кератиноцитов HaCaT. Было выявлено дифференцированное действие сапонины на данную клеточную культуру в диапазоне концентраций 0,04-3,98 мг/мл.

3 Ввиду резкого скачкообразного роста летальности при действии нарастающих доз некоторых токсикантов (гемцитабин, сапонин) определение  $LC_{50}$  не представлялось возможным.

4 Этиловый спирт оказал дифференцированное воздействие на культуры кератиноцитов HaCaT и моноклеарных лейкоцитов. При краткосрочной инкубации токсический эффект отсутствует. После 24-х часов инкубации с кератиноцитами HaCaT наблюдался выраженный токсический эффект. Расчётное значение  $LC_{50}$ - 48,6 мг/мл. Интенсивный рост летальности отмечается при концентрации 62,0 мг/мл (8%). Напротив, моноклеарные лейкоциты подвергались выраженному токсическому воздействию при краткосрочной инкубации (30 минут-1 час). Расчётное значение  $LC_{50}$ - 15,8 мг/мл (2%). Интенсивный рост летальности при концентрации 62,0 мг/мл (8%).

5 Для культуры моноклеарных лейкоцитов наблюдался крайне низкий токсический эффект НПВС мелоксикам. Наблюдался токсический эффект данного лекарственного средства на культуру кератиноцитов HaCaT в диапазоне концентраций 0,1-2 мг/мл.

6 Было выявлено дифференцированное действие атипичного нуклеозида гемцитабина на культуру фибробластов человека. Применение гемцитабина позволило достигать воспроизводимого высокого летального эффекта на клеточные культуры.

**Заключение.** Применение данной методики позволяет оценить токсический эффект различных веществ для культур клеток. 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.

**Информация о внедрении результатов исследования.** По результатам настоящего исследования опубликовано 7 статей в сборниках материалов, 1 тезисы доклада, получен 1 акт внедрения в образовательный процесс (кафедра микробиологии, вирусологии, иммунологии БГМУ), 1 акт внедрения в производство (Лаборатория экспериментальной медицины, фармакологии, токсикологии НИЧ БГМУ).

#### Литература

1. 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.

2. Yang, H. Differential expression and regulation of prohibitin during curcumin-induced apoptosis of immortalized human epidermal HaCaT cells / H. Yang // *International Journal of Molecular Medicine*. – 2014. – № 33 – P. 507-514.

3. Titov, L. P. Microarray detection of highly expressed genes in peripheral blood mononuclear leukocytes from patients with chronic ethanol intoxication / L. P. Titov, K. I. Pavlov, A. B. Kapitau // *Abstracts from the European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress, 6–10 June 2015, Barcelona, Spain*. – Barcelona, 2015. – № 1046. – P.435.