

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КУЛЬТУР ЛИМФОЦИТОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ ДЛЯ ОЦЕНКИ И ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ТОКСИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

А. В. Горшенин

*Научно-исследовательский институт гигиены токсикологии и профпатологии
Федерального медико-биологического агентства, Волгоград*

Показана возможность прогнозирования токсических свойств физиологически активных веществ для человека с использованием культур лимфоцитов человека и лабораторных животных. На основании экспериментальных данных получены математические модели прогноза токсичности изучаемых соединений для человека.

Ключевые слова: лимфоцит, физиологически активное вещество, цитотоксичность.

USING MAMMALIAN LYMPHOCYTE CELL CULTURES FOR ASSESSMENT AND PREDICTION OF TOXIC EFFECTS OF PHYSIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES

A. V. Gorshenin

The possibility of predicting toxic properties of physiologically active substances in humans with the use of human and animal lymphocyte cultures is discussed. On the basis of experimental data we obtained mathematical prediction models for toxicity of test compounds to humans.

Key words: lymphocyte, a physiologically active substance, cytotoxicity.

В настоящее время все большее значение в исследованиях токсичности различных классов физиологически активных веществ (ФАВ) приобретают методы с использованием культур клеток и тканей [2, 4]. Подобный подход является достаточно популярным, так как позволяет значительно экономить время и уменьшить количество используемых в эксперименте лабораторных животных. Еще одно преимущество данного способа изучения токсичности заключается в том, что имеется возможность работы с культурами клеток и тканей человека, в то время как большинство токсикологических исследований и изучение механизма действия ФАВ на человеческом организме невозможны. Особое внимание ряда исследователей привлекают иммунокомпетентные клетки, и, в частности, лимфоциты [1, 5]. Это связано как с высокой чувствительностью клеток иммунной системы к воздействию химических соединений, так и с тем фактом, что данная популяция иммунокомпетентных клеток может быть относительно легко и в достаточном для исследований количестве выделена как у лабораторных животных, так и у человека.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Оценка возможности прогнозирования токсикометрических параметров химических веществ для человека по совокупности токсикологических и цитотоксических показателей.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использованы Т-2 токсин, афлатоксин В₁ и охратоксин А фирмы «Sigma», а также иприт,

люизит и 2,3,7,8-тетрахлордибензо-пара-диоксин (2,3,7,8-ТХДД, диоксин), содержащие не менее 95 % основного вещества.

Эксперименты проведены на нелинейных белых мышах, мышах линий С57В1/6 и СВА, белых нелинейных крысах. При работе с экспериментальными животными руководствовались требованиями приказа Минздрава СССР №755 от 12.08.1977 г. Животных выводили из эксперимента передозировкой диэтилового эфира. Помимо этого, для исследования цитотоксичности ФАВ использовалась кровь здоровых доноров, отобранная в асептических условиях.

Оценка цитотоксических свойств ФАВ на культурах лимфоцитов лабораторных животных и человека проводилась в опытах *in vitro*. Селезенку экспериментальных животных выделяли в стерильных условиях, клеточную суспензию получали в гомогенизаторе Поттера. Лимфоциты из периферической крови и селезенки выделяли в градиенте плотности по Воуит [3]. Рабочая концентрация лимфоцитов крови человека и спленоцитов экспериментальных животных составила $2 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл. Количество жизнеспособных клеток — не менее 95 %. Культивирование клеток проводили в 96-луночных планшетах в среде RPMI1640 с добавлением 10%-й фетальной сыворотки, 2мМ L-глутамина, 100 мкг/мл гентамицина и $2 \cdot 10^{-5}$ М 2-меркаптоэтанола в течение 68 ч в атмосфере, содержащей 5 % CO₂ при 100 % влажности. Затем в культуры добавляли изучаемые соединения в различных концентрациях. Инкубация культур клеток с исследуемыми вещества-

ми составляла 4 ч. В последующем в каждую лунку добавляли по 1 мкКи [³H]-тимидина (молярная активность 40...60 Ки/моль) на 2 ч. Подсчет активности проб производился жидкостно-сцинтилляционным методом. Среднеэффективную концентрацию (EC₅₀) определяли по степени ингибирования синтеза ДНК в культурах лимфоцитов с оцениваемыми ФАВ по сравнению с контрольными культурами, содержащими только растворитель. В качестве растворителя использовали диметилсульфоксид, разведенный культуральной средой до 1%-й концентрации, которая, как было предварительно установлено, не влияет на уровень синтеза ДНК в лимфоцитах. Величины EC₅₀ рассчитывали пробит-методом по соответствующей программе.

Показатели острой токсичности исследуемых токсикантов оценивали при их внутривенном введении. Величины LD₅₀ рассчитывали пробит-методом по соответствующей программе.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Данные по цитотоксическим свойствам изученных соединений представлены в табл. 1.

Таблица 1

Цитотоксические свойства ФАВ для лимфоцитов млекопитающих

Исследуемые соединения	Концентрация, вызывающая 50 % угнетение синтеза ДНК, EC ₅₀ , мг/мл		
	мыши нелинейные	крысы нелинейные	человек
Т-2 токсин	$1,4 \cdot 10^{-7}$	$5,9 \cdot 10^{-7}$	$1,1 \cdot 10^{-7}$
Люизит	$8,0 \cdot 10^{-8}$	$1,9 \cdot 10^{-7}$	$5,6 \cdot 10^{-6}$
Иприт	$2,2 \cdot 10^{-3}$	$9,9 \cdot 10^{-5}$	$7,3 \cdot 10^{-4}$
Афлатоксин В ₁	$4,0 \cdot 10^{-4}$	$7,5 \cdot 10^{-4}$	$2,3 \cdot 10^{-4}$
2,3,7,8-ТХДД	$1,6 \cdot 10^{-2}$	$3,2 \cdot 10^{-1}$	$6,0 \cdot 10^{-3}$

Из представленных в табл. 1 данных видно, что наибольшей токсичностью для культур лимфоцитов лабораторных животных и человека обладают Т-2 токсин и люизит, в то время как значительно меньшие цитотоксические свойства по отношению к культурам лимфоцитов наблюдаются у афлатоксина В₁, иприта и диоксиана. Наблюдается значительная межвидовая вариабельность цитотоксичности изученных токсикантов, максимальные различия которой выявлены в случае воздействия люизита (до 70 раз) и 2,3,7,8-ТХДД (до 53 раз). Помимо этого, отмечены существенные колебания внутривидовой чувствительности лимфоцитов к ФАВ (табл. 2). Так, различия в цитотоксичности исследуемых соединений для лимфоцитов мышей двух линий (С57Вl/6 и СВА) составляют от 1,7 до 26,3 раз.

Важнейшим аспектом использования полученных в ходе исследований *in vitro* результатов по чувствительности клеточных культур является возможность прогнозирования на их основе токсичности изучаемых соединений для человека. При этом на основе полученных *in vitro* данных по цитотоксичности ФАВ для культур лимфоцитов животных и человека и результатов токсикологической оценки химических веществ *in vivo* могут быть получены математические модели прогноза токсичности изучаемых соединений для человека. Пример подобного расчета приведен на рис., где описана зависимость между EC₅₀ и LD₅₀ иприта.

Таблица 2

Цитотоксические свойства ФАВ для лимфоцитов различных линий мышей

ФАВ	Значения EC ₅₀ для культур лимфоцитов, мг/мл		Интенсивность различий, раз
	мыши С57Вl/6	мыши СВА	
Афлатоксин В ₁	$5,2 \cdot 10^{-4}$	$6,8 \cdot 10^{-4}$	1,7
Т-2 токсин	$3,3 \cdot 10^{-5}$	$1,6 \cdot 10^{-5}$	2,1
2,3,7,8-ТХДД	$1,6 \cdot 10^{-2}$	$2,5 \cdot 10^{-1}$	15,6
Охратоксин А	$5,0 \cdot 10^{-2}$	$1,9 \cdot 10^{-3}$	26,3

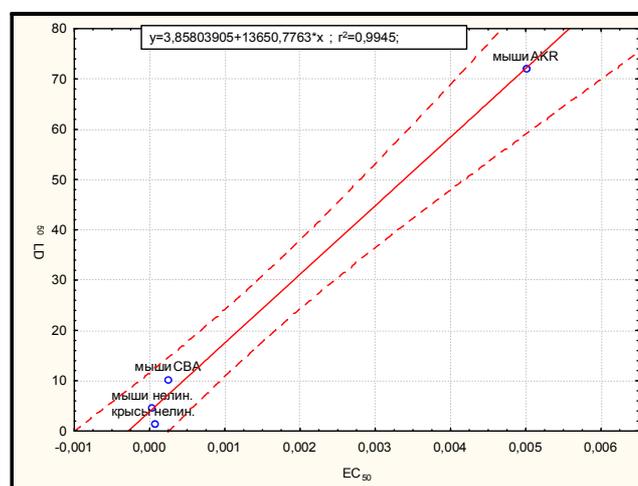


Рис. Зависимость между острой токсичностью и цитотоксичностью иприта

Вычисленная по приведенному на рис. уравнению LD₅₀ иприта для человека при внутривенном введении составляет 10,66 мг/кг. Аналогичные расчеты были проведены для Т-2 токсина, охратоксина А, люизита и 2,3,7,8-ТХДД. Расчетные среднесмертельные дозы этих веществ для человека и уравнения регрессии, полученные на основании исследований *in vitro* и *in vivo* представлены в табл. 3.

Таблица 3

Расчетные параметры LD₅₀ исследованных ФАВ для человека

Исследуемые соединения	Расчетная величина LD ₅₀ , мг/кг	Уравнение регрессии
Иприт	10,66	LD ₅₀ = 3,8580 + 13650,78 · EC ₅₀
Т-2 токсин	3,17	LD ₅₀ = 3,5545 – 3455442,75 · EC ₅₀
Охра-токсин А	4,12	LD ₅₀ = 4,1167 – 23,39 · EC ₅₀
Люизит	9,19	LD ₅₀ = 6,4763 + 311543,23 · EC ₅₀
2,3,7,8-ТХДД	0,05	LD ₅₀ = 0,0309 + 3,7666 · EC ₅₀

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, культуры иммунокомпетентных клеток млекопитающих, в частности лимфоцитов, могут широко применяться в токсикологических исследованиях при получении исходных данных, необходимых для прогнозирования токсикометрических показателей ФАВ для человека. Предлагаемые методы могут быть использованы и при оценке фармакологической активности новых лекарственных средств при проведении их доклинических и клинических исследований. При-

менение клеточных культур позволяет значительно ускорить и удешевить токсикологическую оценку вновь синтезируемых химических веществ за счет снижения количества используемых экспериментальных животных и повышения производительности метода с учетом современных способов детекции жизнеспособности клеток в культуре.

ЛИТЕРАТУРА

1. Болтина И. В. // Актуальные проблемы транспортной медицины. — 2010. — № 4. — С. 111—119.
2. Еропкин М. Ю., Еропкина Е. М. Культуры клеток как модельная система исследования токсичности и скрининга цитопротекторных препаратов. — СПб.: Морсар АВ, 2003. — 239 с.
3. Boyum A. // Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. — 1967. — Vol. 21 (suppl. 97). — P. 77—89.
4. Huang R., Southall N., Cho M. H., et al. // Chemical Research in Toxicology. — 2008. — Vol. 21(3). — P. 659—667.
5. Mehta G., Singh S. P., Pandey S. K., Sharma L. D. // Toxicology International. — 2008. — Vol. 15 (2). — P. 97—101.

Контактная информация

Горшенин Андрей Вадимович — к. м. н., заведующий лабораторией иммунологии ФГУП «НИИ ГТП» ФМБА России, e-mail: gorshenin@rihtop.ru