

УДОСКОНАЛЕНА МОДЕЛЬ МУЛЬТИОРГАННОЇ СИСТЕМИ ТОКСИЧНОСТІ КСЕНОБІОТИКІВ НА ОСНОВІ КО-КУЛЬТИВУВАННЯ КЛІТИН ЛЮДИНИ IN VITRO

¹І.М.Трахтенберг, ²Ю.Й. Кудрявцев, ¹М.Л. Марченко, ²Н.О. Безденєжних, ³М. Фахмі

¹Інститут медицини праці НАМН України, м. Київ

²Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, м. Київ

³Національний медичний університет імені О.О. Богомольця

РЕЗЮМЕ. В умовах експерименту *in vitro* ми створили найпростішу модель мультиорганних ко-культур, де клітини різних тканин людини (лінії A-549, Hep-G2, HaCaT, IMR-32) висаджували в лунки при додаванні поживного середовища, яке містило солі металів, створювали єдину систему завдяки їх з'єднанню за допомогою каналів. Результати показали, що при значній загибелі клітин печінки під дією сульфату кадмію (лінія клітин HepG2) в моделі ко-культур функції детоксикації приймають на себе клітини інших тканин, найбільше кератиноцити лінії HaCaT. При дії сульфату марганцю в концентрації, яка викликала загибель тільки 29% клітин печінки, система ко-культур в цілому справлялася з токсичним навантаженням, в результаті чого стабільність такої системи підвищувалась — життєздатність усіх клітин в ко-культурі була більше 50% порівняно з контрольними культурами клітин, які знаходились в ізольованих лунках.

Отримані попередні результати, які свідчать про перспективність використання запропонованої експериментальної мультиорганної системи *in vitro*, яка дозволить більш об'єктивно оцінювати токсичність хімічних сполук для організму людини.

Ключові слова: модель мультиорганних ко-культур.

РЕЗЮМЕ. В условиях эксперимента *in vitro* нами была создана простейшая модель мультиорганых ко-культур, где клетки различных тканей человека (линии A-549, Hep-G2, HaCaT, IMR-32), высеванные в лунки, при добавлении питательной среды, содержащей соли металла, образовывали единую систему благодаря их соединению с помощью каналов. Результаты показали, что при значительной гибели клеток печени под действием сульфата кадмия (линия клеток Hep-G2) в модели ко-культур функции детоксикации принимают на себя клетки других тканей, преимущественно кератиноциты линии HaCaT. Вследствие воздействия сульфата марганца в концентрации, которая вызывала гибель только 29% клеток печени, система ко-культур в целом справлялась с токсической нагрузкой, в результате чего стабильность такой системы повышалась — выживаемость всех клеток в ко-культуре была более 50% по сравнению с контрольными культурами, которые находились в изолированных лунках.

Полученные предварительные результаты свидетельствуют о перспективности использования предложенной экспериментальной мультиорганной системы *in vitro*, которая позволит более объективно оценивать токсичность химических соединений для организма человека.

Ключевые слова: модель мультиорганых ко-культур.

SUMMARY. In experiments *in vitro* we have created a simple model of multiorgan co-cultures, where cells of various human tissues (line A-549, HepG2, HaCaT, IMR-32), sown in the wells, after adding of growth medium containing salt of heavy metals, formed a unified system through their connection with channels. The results showed that a significant loss of liver cells under the action of cadmium sulfate (cell line HepG2) in a model of co-cultures of the function of detoxification take on the cells of other tissues, predominantly keratinocytes of HaCaT cell line. Due to the impact of manganese sulfate at a concentration that caused the death of only 29% of liver cells, the system of co-cultures as a whole to cope with the toxic load, resulting in increased stability of the system — the survival of all cells in co-culture was more than 50% compared with control cultures, which were grown in isolated wells.

The preliminary results indicate the prospects of using the proposed experimental multiorgan system *in vitro* that will allow a more objective assessment of the toxicity of chemical compounds for the human body.

Key words: model of multiorgan co-cultures.

У сучасній професійній токсикології та фармакології переважають методи дослідження хімічних речовин *in vivo* з використанням експериментальних тварин. Як підкреслювалося ще у 1991 р. на сесії загальних зборів АМН СРСР, а пізніше у доповідях ряду інших наукових форумів: "...досліди на тваринах залишаються в наш час найкращим, а часто єдиним допустимим методом виявлення токсичного ефекту. Зміни такої практики у майбутньому є маловірогідними" [1].

У той же час останніми роками все помітніше стає тенденція до значного зростання використання в практиці токсикологічного експерименту дослідів *in vitro*. Необхідно підкреслити, що досить детально

цей напрямок у токсикологічних дослідженнях був розглянутий і на чотирьох конгресах з біоетики, де особливо підкреслювалась виправданість широкого використання в токсикології методів *in vitro* [2].

З подальшим розвитком оцінки токсичності ксенобіотиків з використанням культур клітин головною проблемою залишається відповідність даних з токсичності речовин, отриманих *in vitro*, до реальної їх небезпеки для цілісного організму. Існують математичні моделі, за допомогою яких за показниками EC_{50} (ефективна концентрація речовини в поживному середовищі, що викликає загибель 50% клітин), отриманими в ізольованих культурах клітин *in vitro*, є можливість

приблизно розрахувати LD_{50} для щурів [3]. Однак такі модельні системи не дають можливості скласти чітку уяву щодо впливу взаємозв'язків між окремими органами та системами на дію токсичної сполуки в умовах цілісного організму. Залишається неясним, чи збільшується цей вплив за рахунок більшої чутливості окремих органів та тканин, або зменшується за рахунок того, що менш чутливі органи та тканини приймають на себе токсичне навантаження. Існуючі експериментальні методи оцінки цитотоксичності речовин *in vitro* використовують такі моделі, як первинні культури клітин, постійні клітинні лінії, зрізи тканин або ж перфузовані ізольовані органи. Однак такі мето-

дики встановлення загальної цитотоксичності чинника доцільно використовувати лише з метою спрощеної оцінки його токсичного ефекту, який можна чекати *in vivo* [4, 5]. На сьогоднішній день у якості рутинних під час другого етапу токсикологічної перевірки косметичних засобів та деяких ліків вже використовуються методи оцінки токсичності *in vitro* з метою більш чіткого моделювання їхньої можливої токсичної дії *in vivo*. На завершальній стадії досліджень цю дію моделюють на тваринах і отримані дані екстраполюють на людину. Наведений вище підхід є найбільш визначним на сьогодні для оцінки токсичності речовин, оскільки не існує інших моделей, які б повністю відповідали складній фізіології та біохімії живого організму [6]. Поряд з цим існує ще актуальна проблема видової специфічності токсикологічних реакцій клітин як *in vitro*, так й *in vivo*. Зокрема, нами було показано, що результати експериментів *in vitro* на клітинах тварин або *in vivo* на лабораторних тваринах не відповідають реальній токсичності ксенобіотиків для організму людини. Найбільш адекватними щодо реальної токсичності для людини *in vivo* є лише експерименти *in vitro* з використанням культур клітин людини, нормальних чи трансформованих [7]. У зв'язку з цим стає зрозумілим, що для заміни дослідів на тваринах необхідне створення таких клітинних систем *in vitro*, які б максимально відповідали умовам *in vivo* з врахуванням як видової, так і тканинної специфічності. Саме такий підхід забезпечить наявність факторів, критичних при проявах ефектів інтоксикації в цілісному організмі. Оскільки живий організм являє собою інтегровану систему взаємопов'язаних між собою органів та тканин, є логічним, що саме ця взаємодія є основною у розумінні кінцевого змісту і прояву токсичного ефекту. Тому було б доцільно відтворити таку модель живого організму людини *in vitro*, яка б моделювала міжтканинну і міжорганну взаємодію. В цьому контексті привертає увагу система інтегрованих дискретних культур нормальних клітин кількох органів (IdMOC) і клітин раку молочної залози, запропонована Li A.P. із співавторами [8], яка була викорис-

тана для дослідження комбінованої дії протипухлинних препаратів на нормальні та пухлинні клітини. Така система ко-культивування клітин відтворює одночасний вплив протипухлинного препарату не тільки на пухлину, а й на клітини деяких нормальних тканин. Ця система дає змогу спостерігати одночасний вплив на нормальні та пухлинні клітини як хіміопрепаратів, модифікованих міжорганною взаємодією, так й їхніх метаболітів, продуктів цитолізу клітин і таке ін. Недоліком запропонованої системи є дещо обмежений мультиорганний спектр нормальних клітин (гепатоцити, клітини нирки, легені, астроцити та ендотеліальні клітини), які вимагають дуже специфічних умов культивування і мають обмежений термін життя *in vitro*.

На наш погляд, така модель представляє інтерес не тільки для дослідження активності протипухлинних препаратів, а й для визначення впливу інших хімічних речовин в умовах *in vitro*. Базуючись на цій ідеї, ми розробили іншу просту модель *in vitro* для тестування токсичності хімічних сполук, засновану на використанні пухлинних клітин замість нормальних. **Метою** даної роботи було проаналізувати зміни показників токсичного впливу хімічних речовин у системі ко-культур органоспецифічних клітин в порівнянні з реакцією на токсичний вплив культур клітин, що культивуються окремо.

Матеріали та методи дослідження **Культивування клітин.**

В експериментах були використані постійні клітинні лінії людини різного тканинного походження: лінія з недрібноклітинного раку легені -A-549, лінія з гепатоми — HepG2, клітини нейробластоми — лінія IMR-32, а також іморталізовані нормальні кератиноцити — лінія HaCaT. Клітини культивували в повному поживному середовищі RPMI 1640, що містило 4 ммоль/л L-глутаміну, 10% ембріональної сироватки теляти, 40 мкг/мл гентаміцину ("SIGMA", США) у зволоженій атмосфері з 5% CO₂ при 37⁰C. Заміну середовища проводили кожні 2 доби. Пересів клітин здійснювали за допомогою розчину версена при утворенні клітинами на субстраті суцільного моношару (4-5 доба росту). Всі клітинні лінії отримані з Клітинного Банку ліній з тканин

людини та тварин ІЕПОР ім. Р.Є.Кавецького НАН України.

Цитотоксичні чинники. Як токсичні чинники використовували розчин хімічно чистих солей важких металів сульфат кадмію і сульфат марганцю у деіонізованій воді.

Фарбування МТТ [9]. Клітини висаджували на 96-лункові планшети в концентрації 1x10⁵/мл по 100 мкл на лунку у повному ростовому середовищі. Через 24 години до клітин вносили розчин досліджуваних солей важких металів у різній концентрації. Через 24 годин культивування в середовище вносили барвник МТТ (3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue) (SIGMA, США) по 10 мкл/лунку в концентрації 5 мг/мл на 3 години. Після цього планшет центрифугували (1500 об/хв протягом 5 хв.), видаляли супернатант й додавали в кожен лунку по 50 мкл DMSO (диметилсульфоксид; SERVA) для розчинення кристалів формазану. Через 30 хвилин інкубації при кімнатній температурі визначали оптичну густину (ОГ) вмісту лунок при довжині хвилі 540 нм за допомогою мультилункового спектрометра Мультискан (Швеція). В якості контролю використовували порожні лунки та лунки з клітинами, в які не додавали ксенобіотик. Дію кожної речовини досліджували у чотирьох повторях, кожний експеримент повторювали тричі. Статистичний аналіз, проведений за t-критерієм Стьюдента, достовірною різницею між показниками вважали при рівні P<0,05.

Результати та їх обговорення

Як відомо, солі важких металів широко застосовуються в промисловості. Токсичність їх загальновідома, однак механізми цієї токсичності, тканинна вибірковість дії багатьох хімічних сполук залишається мало дослідженою. В цілому токсичність сполук при інтоксикації цілого організму визначається не тільки їх прямою дією на клітини-мішені, а й опосередковано: при загибелі клітин відбувається значний викид безпосередньо у міжклітинний простір протеолітичних ферментів, ініціюються вільнорадикальні реакції, а з ними розвивається оксидативний стрес. В результаті цих процесів виділяються медіатори запалення та токсичні продукти клітинної деградації, що

надалі доповнюють загальну картину токсикозу. Виходячи з цього, створення моделі загальної токсичності для клітин і тканин різних органів повинно забезпечити відтворення всіх згаданих процесів у системі *in vitro*. Використовуючи ідею системи IdMOC [8], ми створили свою спрощену модель мультиорганної системи токсичності (МОСТ), яка забезпечує міжорганний обмін на рівні гуморальних компонентів за рахунок системи каналів, що об'єднують клітинні об'єкти *in vitro*, але виключають їх фізичний контакт.

Згадана вище система IdMOC передбачає використання культур нормальних клітин різних органів, однак це створює, як вказувалось, багато труднощів. Разом з тим, відомо, що пухлинні клітини, залежно від рівня диференціювання, можуть певною мірою зберігати чутливість до хімічних сполук, характерну для їх нормальних прототипів. Наші попередні дослідження продемонстрували високий рівень відповідності ступеня токсичності хімічних сполук *in vitro* як для нормальних, так і пухлинних клітин різного гістогенезу ступеня токсичності цих сполук для організму людини [7]. Виходячи з цього, на прикладі сполук важких металів нами продемонстрована найбільш проста модель мультиорганної системи токсичності (МОСТ) на основі ко-культивування *in vitro* не нормальних, а трансформованих клітин. Перевагою такої системи МОСТ є простота у використанні та доступність клітинних об'єктів різного гістогенезу, їх достатньо висока популяційна та цитогенетична стабільність, можливість чітко стандартизувати умови експерименту, легко моделювати проліферативний статус культур, значно розширювати тканинний спектр окремих моделей з врахуванням метаболічних особливостей клітин. Автономність росту трансформованих клітин виключає необхідність використання специфічних і дорогих ростових компонентів, дія яких може змінювати реакцію клітин на хімічні та інші чинники. Використання описаної системи МОСТ дає можливість досліджувати такі параметри:

- одночасний метаболізм ксенобіотиків в клітинах різних органів;
- клітини-мішені, найбільш чут-

ливі до дії даного ксенобіотика в умовах моделі МОСТ;

- міжклітинна взаємодія органів та систем;
- дія тканинно-специфічних факторів, що виділяються клітинами у відповідь на токсичний чинник;
- порівняльні показники токсичності в моделі, подібній до умов цілісного організму.

В основі реалізації моделі МОСТ лежить ко-культивування клітин у луночках планшет, які поєднані між собою отворами, що виключає можливість прямого контакту між клітинами різних тканин, однак дає можливість обмінюватись клітинам розчинними компонентами мікрооточення — факторами міжорганної взаємодії, тканинно-специфічними продуктами токсичної дії ксенобіотиків, їх метаболітами та ін.

При проведенні експерименту клітини висаджували в лунки 96-лункової планшети у концентрації 10^5 /мл по 100 мкл/лунку. Дослідні луночки, об'єднані між собою за допомогою спеціально зроблених каналів, сполучаються між собою поживним середовищем з дослідною хімічною речовиною певної концентрації. Солі важких металів сульфати кадмію і марганцю використовували у концентрації, підібраній у попередніх експериментах з використанням різних клітинних ліній.

Базуючись на чутливості клітин різних тканин, за основу використовували концентрацію солей, що викликає загибель 50% клітин (EC_{50} — ефективна концентрація) нейробластоми IMR-32, що відрізняється відносно високою чутливістю до ксенобіотиків. Окрім нейробластоми в експериментах використовували гепатоцити (гепатома HepG2), клітини шкіри (кератиноцити лінії HaCaT) та прототип альвеоліцитів клітини аденокарциноми легені лінії A-549. Контролем служили клітини цих же ліній, які розміщували в ізолюваних лунках з такою ж самою концентрацією чинника в поживному середовищі, як в досліді, а також інтактні клітини ізолювані або в об'єднаних лунках у відсутності чинників. Після інкубації клітин з хімічним чинником протягом 24 годин кожен лунку 96-лункового планшети фарбували МТТ за методикою, що вказана вище.

При вмісті в лунці сульфату кадмію у концентрації $0,025 \pm 0,006$ мг/мл (EC_{50}) найбільш чутливими до цитотоксичної дії цієї сполуки виявились гепатоцити і нейробласти, а клітини легені та шкіри були відносно резистентними. При ко-культивуванні токсичність сульфату кадмію залишалась аналогічною для всіх ізолюваних клітин, окрім кератиноцитів, чутливість яких дос-

Таблиця 1

Порівняння показників цитотоксичної дії сульфату кадмію на клітини ізолюваних та ко-культивованих культур різного гістогенезу ($p < 0,05$)

Лінії клітин	A-549	HaCaT	IMR-32	HepG2
Життєздатність культур клітин в ізолюваних лунках, %	73±4	100±10	59±6	25±3
Життєздатність культур клітин у моделі ко-культур, %	71±5	80±5	57±4	23±3

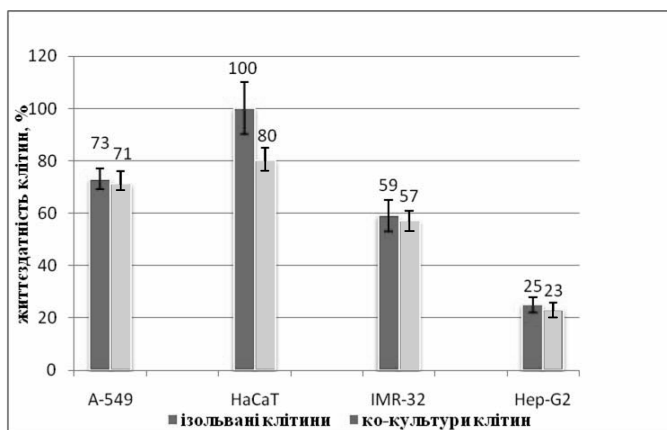


Рис. 1 Порівняння показників цитотоксичної дії сульфату кадмію на клітини ізолюваних та в ко-культивованих культурах ($p < 0,05$)

товірно зростала (табл.1, рис. 1).

Зростання чутливості кератиноцитів можна пояснити тим, що у разі значного ураження печінки шкіра може частково брати на себе функцію детоксикації організму. В наших експериментах у системі МОСТ клітини шкіри, дійсно, прийняли на себе навантаження по боротьбі з токсинами як з сіллю кадмію, так і тими, що з'явилися в системі в результаті часткової загибелі та ураження клітин в інших культурах. Остаточні механізми виявленого нами феномену ще потребують детального аналізу, однак цікаво: одержані дані підтверджують результати недавніх досліджень [10] щодо вибіркової токсичності сполук кадмію саме для шкіри.

Для аналізу дії сульфату марганцю в ко-культури також була використана концентрація солі, яка становить EC_{50} для нервових клітин IMR-32 ($0,2 \pm 0,05$ мг/мл), але є менш токсичною для клітин тканин інших органів. На відміну від сульфату кадмію, сульфат марганцю у вказаній концентрації викликав загибель $50 \pm 5\%$ нервових клітин в ізолюваних лунках, але тільки $29 \pm$

сіллю кадмію — клітини одних тканин можуть зменшувати токсичне навантаження на більш чутливі клітини. У випадку з сіллю марганцю спостерігається незначне зниження життєздатності клітин легенів та шкіри, та помітне збільшення життєздатності клітин у культурах нервової тканини та печінки в ко-культури порівняно з культурами клітин, що знаходились ізолювано. Очевидно, що більш стійкі клітини легенів та шкіри, життєздатність яких незначно знизилась у присутності використаної концентрації солі марганцю, розподілили міждетоксикаційну функцію, внаслідок чого гепатоцити змогли повністю подолати навантаження в системі та відновитися. Логічно, що зниження загальної токсичності у системі привело і до зростання життєздатності нервових клітин. Не дивлячись на те, що життєздатність клітин легенів та шкіри в системі ко-культур незначно знизилась, в цілому стабільність системи в даному випадку зростає, життєздатність усіх клітин стала більшою 50% порівняно з контрольними культурами, де клітини знаходились ізолювано.

Таблиця 2

Порівняння показників цитотоксичної дії сульфату марганцю на клітини ізолюваних та ко-культивованих культур різного гістогенезу ($p < 0,05$)

Лінії клітин	A-549	HaCaT	IMR-32	HepG2
Життєздатність культур клітин в ізолюваних лунках, %	84±4	100±5	50±4	71±6
Життєздатність культур клітин у моделі ко-культур, %	78±3	95±5	62±3	100±7

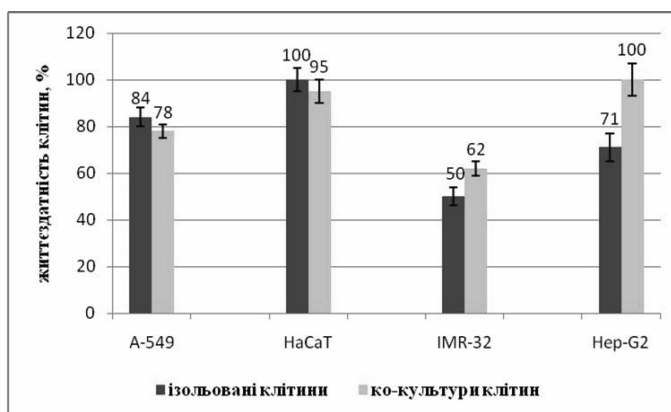


Рис.2 Порівняння показників цитотоксичної дії сульфату марганцю на клітини в ізолюваних та в ко-культивованих культурах ($p < 0,05$).

4% клітин печінки. (табл. 2, рис. 2)

У цьому експерименті виявляється тенденція, аналогічна тій, що спостерігалася у досліджах із

Таким чином, на прикладі солей важких металів нами продемонстрована нова клітинна модель МОСТ, яка дає змогу побачити реальні

зміни в очікуваній токсичності ксенобіотиків в умовах міжорганної взаємодії. Така система мультиорганної токсичності *in vitro* дозволяє не тільки визначення змін у рівні токсичності речовин для клітин людини, але допускає й дослідження чинників, що можуть виконувати роль антидотів та їхню тканинну специфічність.

Висновки

1. Токсикологічні дослідження з використанням моделі мультиорганної системи токсичності (МОСТ) на етапі санітарно-гігієнічної експертизи та оцінки токсичності хімічних сполук дає можливість краще зрозуміти механізми взаємодії органів та систем цілісного організму при детоксикації хімічних речовин та більш коректно екстраполювати дані дослідів *in vitro* на організм людини.
2. Дослідження з використанням моделі МОСТ показали, що клітини шкіри і печінки є найбільш активними у прояві детоксикуючих функцій в умовах міжорганної взаємодії. Створена модельна система чітко доводить, що міжорганна взаємодія може суттєво впливати на кінцевий результат дії ксенобіотика в організмі, що вказує на доцільність і перспективність використання цієї нової системи для оцінки реальної дії хімічних сполук.
3. Життєздатність клітин у ко-культури знаходилась у прямій залежності від того, клітини якого органного походження здатні прийняти на себе максимальне навантаження. За масивної загибелі клітин печінки (лінія клітин HepG2), яка виконує головну роль в детоксикації організму, у системі ко-культур цю функцію приймають на себе переважно кератиноцити. В умовах високої стійкості клітин шкіри і легенів значно відновлюється життєздатність гепатоцитів і нервових клітин. Так, в моделі, де кількість живих клітин печінки становила понад 50% , стабільність системи в цілому зростала, оскільки функція детоксикації перерозподілялась між клітинами печінки, легенів, шкіри (які, як відомо, теж беруть участь у процесах детоксикації).

ЛІТЕРАТУРА

1. Проблема нормы в токсикологии/ [И.М. Трахтенберг, Р.Е. Сова, В.О. Шефтель, Ф.А. Оникиенко]// — Москва "Медицина" 1991 — 203 с.
2. Резников А.Г. Проблемы этики при проведении экспериментальных медицинских и биологических исследований на животных в Украине/ А.Г. Резников [под ред. Ю.И. Кундиева]//Антология биоэтики. — Львов: БаК, 2003 — С. 395-399.
3. Guidance Document on Using in Vitro Data to Estimate in Vivo Starting Doses for Acute Toxicity. / National Institute of Environmental Health Sciences. National Institutes of Health U.S. Public Health Service, Department of Health and Human Services// — 2001 — P. 1 — 21.
4. Альтернативні методи і тест-системи. / [І.М. Трахтенберг, В.М. Коваленко, Н.В. Кокшарева и др. / — Київ ВД "Авіцена", 2008 — 268 с.
5. Jared W. Allen. In Vitro Zonation and Toxicity in a Perfused Hepatocyte Co-Culture / Jared W. Allen, Salman R. Khetani, and Sangeeta N. Bhatia.// Toxicological Sciences — 2004 — Vol.84, №1 — P. 110 — 119
6. Bas J. Blaauboer. The Integrated Use of Alternative Methods in Toxicological Risk Evaluation / Bas J. Blaauboer, Martin D. Barratt, J.Brian Houston// ECVAM Integrated Nesting Strategies Task Force report — ATLA, 2009 -№ 27 — P. 229 — 237.
7. Переваги методу дослідження токсичного впливу сполук важких металів в культурі клітин людини in vitro порівняно з традиційним методом in vivo на тваринах як більш достовірного та адекватного / [І.М. Трахтенберг, М.Л. Марченко, Н.О. Безденежних, Ю.Й. Кудрявець] / Сучасні проблеми токсикології — Київ, ООО "ИИО "Медицина України", 2010 — № 2-3 — С. 69 -72.
8. Li A.P. A novel in vitro system, the integrated discrete multiple organ cell culture (IdMOC) system, for the evaluation of human drug toxicity: comparative cytotoxicity of tamoxifen towards normal human cells from five major organs and MCF-7 adenocarcinoma breast cancer cells. / Li, A.P., Bode, C. & Sakai, Y. // Chem. Biol. Interact. — 2004 — 150(1) — 129 p. — P.36 — 42.
9. Plumb JA. Cell sensitivity assays: the MTT assay / J.A. Plumb / Methods Mol. Med. — 2004 — V.88 -165 p. — P. 9.
10. Cadmium induces intracellular Ca²⁺- and H₂O₂-dependent apoptosis through JNK- and p53-mediated pathways in skin epidermal cell line / YO Son, JC Lee, JA Hitron. [et al.]// Toxicol. Sci. 2010 — Vol. 113, №1 — P.127-137.

Надійшла до редакції 23.02.2011