

ПЕРЕВАГИ МЕТОДУ ДОСЛІДЖЕННЯ ТОКСИЧНОГО ВПЛИВУ СПОЛУК ВАЖКИХ МЕТАЛІВ У КУЛЬТУРІ КЛІТИН ЛЮДИНИ *IN VITRO* ПОРІВНЯНО З ТРАДИЦІЙНИМ МЕТОДОМ *IN VIVO* НА ТВАРИНАХ ЯК БІЛЬШ ДОСТОВІРНОГО ТА АДЕКВАТНОГО

¹І.М. Трахтенберг д.мед.н., член-кор НАН України, акад. НАМН України, ¹М.Л. Марченко, ²Н.О. Безденежних к. біол. н., ²Ю.Й. Кудрявцев д.біол.н.

¹Інститут медицини праці НАМН України, м.Київ

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

РЕЗЮМЕ. З метою створення моделі оцінки токсичності речовин для людини *in vitro* проведено експерименти з використанням культур клітин людини різного тканинного походження (клітини раку легень, печінки, епітелію шкіри, шийки матки — A-549, Hep-G2, HaCat, HeLa, нормальні фібробласти) та культури фібробластів миші. У порівняльних дослідженнях використані три основних тести, за якими оцінювали життєздатність клітин та їх кількість — метилтетразолієвий тест (МТТ), В-сульфородаміновий тест (СРВ) та фарбування клітин нейтральним червоним. За показником IC_{50} встановлено, що дані за цитотоксичністю солей важких металів, отримані для культур клітин людини, відповідають показникам токсичності для людини *in vivo*. В той час як результати експериментів на цурах та мишах *in vivo* і на культурах фібробластів миші *in vitro* не співпадали з показниками токсичності цих речовин для людини. Таким чином, нами зроблені попередні висновки про те, що моделі культур клітин людини можуть бути успішно використані з метою визначення токсичності ксенобіотиків безпосередньо для людини.

Ключові слова: цитотоксичність, IC_{50} , культура клітин, метилтетразолієвий тест, В-сульфородаміновий тест, фарбування нейтральним червоним.

РЕЗЮМЕ. С целью выбора оптимальной модели оценки токсичности веществ для человека *in vitro* на культурах клеток проведены эксперименты на культурах клеток человека различного тканевого происхождения (легкие, печень, кератиноциты и эпителиоциты шейки матки — A-549, Hep-G2, HaCat, HeLa) и культурах фибробластов мыши. В сравнительных исследованиях использованы три основных теста, с помощью которых оценивали количество жизнеспособных клеток — метилтетразолиевый тест (МТТ) [4], В-сульфородаминоновый (СРВ) [5, 7] и тест с нейтральным красным [6]. По показателю IC_{50} (индекс цитотоксичности, концентрация вещества при которой происходит гибель 50% клеток) установлено, что данные цитотоксичности солей тяжелых металлов, полученные с использованием культур клеток человека, практически полностью соответствуют показателям токсичности непосредственно для человека (коэффициент корреляции 0,8). В то время как результаты экспериментов на мышах и крысах *in vivo* и для культур фибробластов мыши *in vitro* не совпадали с показателями токсичности этих веществ для человека. Таким образом, сделан вывод о том, что модели с использованием культур клеток человека могут быть успешно применены в целях определения токсичности ксенобіотиков непосредственно для человеческого организма.

Ключевые слова: цитотоксичность, IC_{50} , культуры клеток, метилтетразолиевый тест, В-сульфородаминоновый тест, тест с нейтральным красным.

SUMMARY. With the purpose of selection of an optimal *in vitro* cell culture model for estimating toxicity of various substances for humans, experiments were performed on human cell cultures of various tissue origins (lung cells, liver cells, cervical keratinocytes and epitheliocytes — A-549, Hep-G2, HaCat, HeLa) and mouse fibroblast cultures. Three basic tests were used in a comparative research for estimation of the amount of viable cells — MTT (methyl tetrazolium test), SRB (sulphorodamine B method) and NRU (neutral red uptake test). According to IC_{50} (cytotoxicity index, a value of drug concentration causing 50% loss of cell viability) it was determined that the values of heavy metal salts cytotoxicity, acquainted on human cell cultures utterly correspond to the toxicity values in humans (correlation coefficient is 0.8), whereas the results of experiments performed *in vivo* on mice and rats and *in vitro* on mouse fibroblast cell cultures do not correlate with the toxicity values for humans. Thus, it is concluded that human cell culture models can be successfully used for the purpose of xenobiotics toxicity determination for human organism.

Key words: cytotoxicity, IC_{50} , cell cultures, methyl tetrazolium test, sulphorodamine B method, neutral red uptake.

Зростання обсягів виробництва хімічних речовин, які використовуються різними галузями народного господарства, та недостатня ефективність класичних методів дослідження ступеня їх токсичності і небезпечності — фактори, що обумовили розвиток нових напрямків у санітарно-гігієнічній оцінці токсичності речовин. Цьому також значно сприяв стрімкий розвиток таких медико-біологічних наук, як біохімія, молекулярна біологія, генна інженерія та ін.

Американською агенцією з безпеки навколишнього середовища (EPA) був складений перелік із 80 000 хімічних речовин, які потребують першочергової санітарно-гігієнічної експертизи. У межах європейської програми REACH (Реєстрація, експертиза та авторизація хімічних речовин), що почала діяти з 2007 року на території Європи, передбачена оцінка безпечності 30 000 вироблених на її території або імпортованих лікарських, косметичних та інших хімічних речо-

вин, якщо їх кількість перевищуватиме 1 тону на рік. За оцінками медичної дослідницької ради Великобританії, на програму буде витрачено 11,5 млрд. доларів, на її реалізацію необхідно 40 років дослідницької роботи та понад 13 000 000 тварин. Відповідно до рекомендацій організації економічного співробітництва, щоб оцінити вплив на організм однієї речовини, необхідно поставити досліди не менше, як на 430 тваринах. Токсикологічна оцінка одного пестициду потребує

до двох років та 10 000 тварин. За оцінками Британського союзу, що виступає за відміну вівісекції (BUAV), щорічно у світі для лабораторних експериментів використовують не менше 115 мільйонів тварин.

Метод визначення гострої токсичності за ЛД₅₀ на тваринах, який є етапом санітарно-гігієнічного нормування, почав використовуватися у світовій токсикологічній практиці ще з 1927 року, але за останні 80 років він жодного разу не був затверджений належним чином за сучасними світовими стандартами (OECD, 1996). Тому в 1984 році Британське товариство з токсикології запропонувало метод фіксованих доз, який передбачає використання меншої кількості тварин у досліді та ставить перед собою мету викликати лише найменший токсикологічний ефект, а не загибель тварин. Сучасні дослідження на тваринах показують велику кількість розбіжностей у результатах, лімітовано відповідають реальним умовам та надають мало даних для передбачення виникнення токсичності у людини. Мультицентром з оцінки цитотоксичності *in vitro* (MEIC) проаналізовано результати дослідів з гострої токсичності у щурів та мишей для 50 хімічних речовин [1, 2, 3]. Отже, стало відомо, що показники ЛД₅₀ для щурів корелюють достатньо високо з цим показником для мишей ($R^2=0,88$), але ЛД₅₀ для мишей та щурів має дуже низький коефіцієнт кореляції при розрахунках гострої летальної концентрації для людей (коефіцієнт кореляції для щурів дорівнює 0,61 та для мишей — 0,65) [Ekwall et al., 1999]. Ще у токсикологічному звіті за 1948 рік було підкреслено, що чутливість людини до деяких хімічних речовин перевищує цей же показник у тварин у 2000 разів [Muller, 1948]. Такі ж результати дали й в інші, більш сучасні дослідження [Himmelstein et al., 1996; Quick and Shuler, 1999; Olson et al., 2000]. Вчені Zbinden та Flury-Roversi (1981) дійшли висновку: "Для визначення симптоматики гострої інтоксикації у людини встановлена летальна доза ЛД₅₀ для тварин має дуже малу цінність." Далі Logke (1983) додає: "... поки ЛД₅₀ не може бути точно виміряне та підтверджене у повторних дослідах, інформація про його числове значення навряд чи буде мати практич-

ну вагомість, тому що екстраполяція від експериментальних тварин на людину залишається дуже важкою задачею." [1, 2]. В Європейській Директиві 86/09 йдеться про те, що з розвитком науково обґрунтованих та практично доведених досліджень без використання тварин, у подальшому в санітарно-гігієнічному нормуванні скорочуватиметься кількість дослідів на тваринах.

Виходячи з припущення, що дія хімічних речовин на живий організм відбувається на клітинному рівні (Grisham and Smith, 1984), багато токсикологічних тестів базується на використанні ліній клітин — альтернативі дослідів з гострої токсичності на тваринах. Комбінації трьох різних тестів на клітинах та прості математичні розрахунки виявилися більш інформативними ($R^2=0,83$) при розрахунках летальної дози для людини (було протестовано 50 хімічних речовин), ніж прогнози, які базуються на значеннях ЛД₅₀ для щурів та мишей ($R^2=0,65$) [Ekwall et al., 1998]. Регулююча інструкція та протоколи рекомендованих *in vitro* досліджень були опубліковані ЕРА та NICEATM у 2001 році. За цими документами рекомендується використання нормальних кератиноцитів людини та інших стандартизованих клітинних ліній, а також за цими даними для оцінки токсичності *in vitro* можуть бути використані показники клітинного метаболізму.

За оцінкою Алана Гольдберга, професора з токсикології Університету Джона Хопкінса, який очолює центр з альтернативних досліджень, більш широке застосування тестів *in vitro*, могло б скоротити кількість тварин, необхідних для реалізації програми REACH на 70 — 80%, а також значно заощадити бюджет, передбачений для виконання цієї програми.

Враховуючи вищесказане, нами були проведені досліді *in vitro* на культурах клітин людини та миші. За допомогою трьох різних методів встановлено показник ІС₅₀ (концентрація речовини, що інгібує ріст або викликає загибель 50% клітин *in vitro*). Отримані показники цитотоксичності для клітин людини та миші були проаналізовані з метою визначення їхньої відповідності щодо небезпечних доз для людини.

Матеріали та методи

Об'єкти. Досліджувані клітини

Нер-G2, A-549, HaCat, Hela, нормальні фібробласти людини та миші (отримані з Банку клітинних ліній ІЕПОР ім.Р.Є.Кавецького НАН України) культивували в повному поживному середовищі RPMI 1640 ("SIGMA", США), що містило 4 ммоль/л L-глутаміну, 10% ембріональної сироватки теляти ("SIGMA", США), 40 мкг/мл гентаміцину у зволоженій атмосфері з 5% CO₂ при 37°C на пластиковому посуді (SenteLab, Україна). Заміну середовища проводили кожні 2 доби. Пересів клітин здійснювали за допомогою розчину Версена при утворенні клітинами на субстраті суцільного моношару (4-5-та доба росту).

Солі важких металів: MnSO₄•H₂O (масова частка основної речовини — 98,18%), HgCl₂ (масова частка основної речовини — 99,6%), CdSO₄•8H₂O (масова частка основної речовини — 98,18%), Pb(CH₃COO)₂•3H₂O (масова частка основної речовини — 99,78%) — були отримані в "Хімлаборактив", Україна. Як розчинник використовували деіонізовану стерильну воду (не більше 1% в кінцевому розчині).

Для дослідження чутливості клітин до солей металів суспензію клітин висаджували на 96-лункові планшети в концентрації 5x10³ — 1x10⁴ клітин/лунку в 100 мкл повного поживного середовища. Через 24 години вносили досліджувані сполуки та інкубували клітини за стандартних умов 24 години, після чого фарбували клітини за допомогою МТТ, Sulforodamine B та нейтрального червоного.

Фарбування МТТ. Після інкубації клітин протягом необхідного часу в кожну лунку 96- лункового планшета вносили по 10 мкл МТТ (3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue) (SIGMA, США) в концентрації 5 мг/мл та інкубували при 37°C у зволоженій атмосфері 3 години; згодом планшет центрифугували (1500 об/хв протягом 5 хв.), видаляли супернатант й додавали до кожної лунки 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 спектрофотометра Мультискан (Швеція). В

Таблиця 1

Порівняння показників ЛД₅₀ для щурів та мишей, одержаних в дослідях *in vivo*, з індексом цитотоксичності ІС₅₀ для культури фібробластів миші *in vitro*

Солі металів	ЛД ₅₀ щури (per os) (мг/кг)	ЛД ₅₀ миші (per os) (мг/кг)	ІС ₅₀ первинні фібробласти миші (мг/л, мг/дм ³)*
HgCl ₂	1	6	9,5 x 10 ⁻²
3CdSO ₄ · 8 H ₂ O	280	1166	53
MnSO ₄ · H ₂ O	2150	2330	100
Pb(CH ₃ COO) ₂ · 3H ₂ O	4665	4800	1000

* — для більш наочного порівняння показників ЛД₅₀ та ІС₅₀ цифрові значення останніх були виражені мг/л або мг/дм³.

Таблиця 2

Порівняння показників токсичності солей металів за смертельними дозами для людини (дані Agency for Toxic Substances and Disease Registry, USA, 1989) при нещасних випадках з ІС₅₀ для культур клітин людини *in vitro*

Солі металів	Токсичність для людини (смертельні дози) мг/кг	ІС ₅₀ (мг/л, мг/дм ³)*				
		Фібро-бласти	Hela	A-549	Hep-G2	HaCat
HgCl ₂	10-42	31	18,7	18	50	12
3CdSO ₄ · 8 H ₂ O	20-30	7	33	27,5	30	14
MnSO ₄ · H ₂ O	104	35	130	400	500	750
Pb(CH ₃ COO) ₂ · 3H ₂ O	Більше 450	930	1500	1700	2000	2000

* — для більш наочного порівняння показників ЛД₅₀ та ІС₅₀ цифрові значення останніх були виражені мг/л або мг/дм³.

якості контролю використовували порожні лунки та лунки з клітинами, в які не додавали ксенобіотик, а також контроль з розчинником — дистильованою, деіонізованою водою (1%) у живильному середовищі для клітин [4, 8].

Фарбування сульфородаміном В (Sulforodamine B) — СРВ-тест. Після інкубації з досліджуваними препаратами клітини фіксували 50% розчином трихлороцтової кислоти (ТХО) (кінцева концентрація 10%) протягом 1 год при 4⁰С і промивали проточною водою. Фарбували фіксовані у лунках клітини 0,4% розчином Sulforodamine B (SIGMA, США) протягом 30 хв. Після видалення барвника лунки промивали 1% розчином оцтової кислоти і розчиняли фарбник додаванням 10мМ розчину Tris-base (тримаючи 10 хвилин на шейкері). Результати дослідження реєстрували за допомогою мульти-лункового спектрофотометра при

довжині хвилі — 540 нм. [9].

Тест з барвником нейтральним червоним. Після культивування клітин з досліджуваними сполуками в кожну лунку вносили середовище, яке містило 2% барвник нейтральний червоний та інкубували протягом 3 годин у зволоженій атмосфері при 37⁰С, потім видаляли супернатант та промивали клітини теплим фізіологічним розчином. Для фіксації клітин та елюації барвника з лізосом у кожну лунку додавали розчин для розчинення нейтрального червоного (1% льодяної оцтової кислоти, 50% етилового спирту, 49% дистильованої води). Результати дослідження реєстрували за допомогою мульти-лункового спектрофотометра при довжині хвилі — 540 нм [10].

Результати та їх обговорення:

Дані щодо цитотоксичності сполук металів, отримані для різних культур клітин, були підтверджені у трьох тестах, які не відрізнялися між

собою за чутливістю (коефіцієнт кореляції — 0,9). Індекс цитотоксичності ІС₅₀ для фібробластів миші був пропорційний ЛД₅₀, отриманому в дослідях з мишами та щурами при пероральному шляху надходження токсиканта (див. таблицю 1). Так, за показниками ЛД₅₀ для мишей відношення токсичностей хлорид ртуті : сульфат кадмію; сульфат кадмію : сульфат марганцю; сульфат марганцю : ацетат свинцю були пропорційними 200:2:2, відповідно. Для клітин миші хлорид ртуті також у сотні разів був токсичнішим за сульфат кадмію, кадмію сульфат у 2 рази за сульфат марганцю, токсичність сульфату марганцю в 10 разів перевищувала таку для ацетату свинцю (див. таблицю 1). У стандартних тестах культури фібробластів миші (10 тис. клітин / лунку для 96-лункової планшети) показали більшу чутливість до дії солей важких металів, ніж цілий організм.

Якщо порівняти дані токсичності для людини (за дослідженнями Agency for Toxic Substances and Disease Registry, USA, 1989) по цих же речовинах, ми можемо відзначити, що вони відрізняються від таких для тварин. Так, токсичність хлориду ртуті майже співпадає з такою для сульфату кадмію, останній для людини приблизно в 3 — 5 разів токсичніший за сульфат марганцю, у якого цей показник у 1,5 раза перевищує такий ацетату свинцю. Дані токсичності вищевказаних речовин для людини майже близькі до тих, що спостерігаються в культурах клітин *in vitro* (коефіцієнт кореляції — 0,8) (див. таблицю 2).

Таким чином, виявлено, що показники токсичності для тварин не відповідають таким для людини, одна й та ж речовина може бути менш токсичною для тварин та більш токсичною для людини як, наприклад, у випадку з сульфатом кадмію. Ці факти підтверджують думку про те, що показники токсичності, отримані в дослідях на тваринах, мало відображають реальну небезпеку хімічних речовин для людини. Отже, стає очевидним, що дані, отримані на культурах клітин людини *in vitro*, більше відповідають справжнім показникам токсичності для людського організму.

Висновки:

1. Показники токсичності для тварин в експериментах *in vivo*, пропорційні тим, що були отримані

- для культури фібробластів миші in vitro.
2. Дози, які викликають 50% загибелі клітин людини в культурі in vitro, пропорційні даним щодо токсичності солей металів для людини.
 3. Спостерігається невисокий відсоток збігу між собою показників токсичності для людини з такими для щурів та мишей.
 4. Надалі рутинні дослідження з визначення цитотоксичності хімічних речовин на культурах клітин людини можна буде з успіхом проводити для розрахунків показників токсичності для людей.

ЛІТЕРАТУРА

1. ECVAM Workshop 50: strategies to replace in vivo acute systemic toxicity testing / A. Gennari et al]. — 2004.
2. ICCVAM (2001) Report of the International Workshop on In Vitro Methods for Assessing Acute systemic Toxicity. ICCVAM-NICEATM workshop, Arlington, VA, USA. — 2000. — NIH Publication No. 01-4499. — P.370
3. Альтернативні методи і тест-системи / І.М.Трахтенберг, В.М. Коваленко, Н.В. Кокшарева та соавт.] //ВД "Авіцена", 2008 — 268 с.
4. Evaluation of a Soluble Tetrasolium/Formazan assay for cell growth and drug sensitivity in Culture using human and other cell lines / D. Scudiero [et al.] // Cancer Res — 1988 -V.48 — 4827 — 4833
5. Evaluation of Colorimetric Protein and biomass Stains for Assaying Drug Effects Upon Human Tumor Cell lines / P. Shekan [et al.] // Proc. Amer. Assoc. Cancer Res., — 1989 — V.30 — 2436
6. Liu D. A rapid biochemical test for measuring chemical toxicity to bacteria of single chemicals and mixture / D. Liu // Toxicity Screening Procedures Using Bacterial Systems — 1981 — New York — P.175 — 194
7. Дослідження механізмів чутливості клітин раку легені людини до комбінованого впливу хіміопрепаратів і гіпертермії в умовах пролонгованої дії інтерферону in vitro / Н.О. Безденежних, Н.Ю. Лук'янова, О.О. Лихова, Ю.Й. Кудрявець //
8. Wilson A. P., Cytotoxicity and Viability Assays in Animal Cell Culture: A Practical Approach, 3rd ed. (ed. Masters, J. R. W.) / A.P. Wilson / Oxford University Press: Oxford 2000, Vol. 1
9. Philip Skehan, Ritsa Storeng, Dominic Scudiero [et. all] / New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening / Philip Skehan, Ritsa Storeng, Dominic Scudiero [et. all] // Journal of the National Cancer Institute, Vol. 82, No. 13,- P. 1107-1112, © 1990 Oxford University Press
10. <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/invidocs/phIIprot/3t3p hIII.pdf> — офіційний сайт ICCVAM.

Надійшла до редакції 19.05.2010