

ТОКСИЧНІСТЬ ДЕЗІНФЕКЦІЙНИХ ЗАСОБІВ НА КУЛЬТУРИ КЛІТИН ЛЮДИНИ *IN VITRO*

Л. В. Адаменко

Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ

Проведені експерименти in vitro з використанням культур клітин людини різного тканинного походження (клітини раку легенів, епітелію шкіри, нирок — А-549, HaCat, 293) з метою створення моделі оцінки токсичності речовин для людини. У порівняльних дослідженнях використані два основних тести, за якими оцінювали життєздатність клітин та їх кількість — метилтетразолієвий тест (МТТ) та фарбування клітин нейтральним червоним.

Ключові слова: ЦИТОТОКСИЧНІСТЬ, IC50, КУЛЬТУРА КЛІТИН, МЕТИЛТЕТРАЗОЛІЄВИЙ ТЕСТ, ФАРБУВАННЯ НЕЙТРАЛЬНИМ ЧЕРВОНИМ

Ступінь токсичності ксенобіотиків (до яких відносяться і дезінфекційні засоби) так або інакше співвідносяться з тривалістю життя і можливістю передчасного старіння організму. Ідеї та методи кількісної оцінки ризику екзогенної хімічної патології, на думку Штабського Б. М. (1999), повинні бути поширені, передусім, на оцінку ризику прискореного старіння внаслідок взаємодії організму з, так званими, малими дозами речовин, а вже потім — на оцінку безпосереднього або опосередкованого ризику атеросклерозу, канцерогенного ризику, ризику для потомства тощо [9].

Американською агенцією з безпеки навколишнього середовища (ЕРА) був затверджений лист з 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 речовин, якщо їх кількість перевищуватиме 1 тону на рік. За оцінками медичної дослідницької ради Великобританії, програма обійдеться у 11,5 млрд. доларів і на її реалізацію піде 40 років дослідницької роботи та більш як 13 000 000 тварин. Відповідно до рекомендацій організації економічного співробітництва для того, щоб оцінити вплив на організм будь-якої однієї речовини, необхідно поставити досліди не менш, як на 430 тваринах. Токсикологічна оцінка одного пестициду займає до двох років та потребує використання 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 LD₅₀ на тваринах, який є етапом санітарно-гігієнічного нормування, почав використовуватися у світовій токсикологічній практиці ще з 1927 року, але за останні 80 років токсикологічних досліджень він жодного разу не був затверджений належним чином за сучасними світовими стандартами (OECD, 1996). Тому у 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 значну кількість розбіжностей у результатах, лімітовано відповідають реальним умовам та дають мало

даних для передбачення токсичності у людини. Мультицентром з оцінки цитотоксичності *in vitro* (MEIC) були проаналізовані результати дослідів гострої токсичності у щурів та мишей для 50 хімічних речовин [1, 2, 3]. З них 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 наведені і в інших, більш сучасних дослідженнях [Himmelstein et al., 1996; Quick and Shuler, 1999; Olson et al., 2000]. Вчені Zbinden та Flury-Roversi (1981) зробили висновок: «Для визначення симптоматики гострої інтоксикації у людини встановлена летальна доза ЛД₅₀ для тварин має дуже малу цінність.» Далі Lorke (1983) додає: «...доти, поки ЛД₅₀ не може бути точно виміряне та підтверджене у повторних дослідях, інформація про його числове значення навряд чи буде мати практичну вагомість, тому що екстраполяція від експериментальних тварин на людину залишається дуже важкою задачею» [1, 2]. В Європейській Директиві 86/09 сказано, що з розвитком науково обґрунтованих та практично доведених досліджень без використання тварин, в подальшому у санітарно-гігієнічному нормуванні буде скорочуватися кількість дослідів на тваринах.

Виходячи з того, припущення, що дія хімічних речовин на живий організм відбувається на клітинному рівні (Grisham and Smith, 1984), багато токсикологічних тестів базується на використанні ліній клітин як альтернативи дослідів з визначення 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 EPA та NICEATM у 2001 році: вони передбачають використання нормальних кератиноцитів людини та інших стандартизованих клітинних ліній; також за цими даними для оцінки токсичності *in vitro* можуть бути використані показники клітинного метаболізму [1, 2].

За оцінкою Алана Гольдберга, професора з токсикології Університету Джона Хопкінса, який очолює Центр 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 дезінфекційних препаратів *in vitro* на культурах клітин людини. За допомогою двох різних методів встановлений показник IC₅₀ (концентрація речовини, що інгібує ріст або викликає загибель 50 % клітин *in vitro*). Отримані показники цитотоксичності для клітин людини були проаналізовані з метою визначення їх відповідності небезпечним дозам, отриманих у дослідях на тваринах.

Матеріали і методи

Досліджувані клітини A-549, HaCat, 293 (отримані з Банку клітинних ліній ІЕПОР ім. Р. Є. Кавецького НАН України) культивували в повному поживному середовищі RPMI 1640 («SIGMA», США), що містить 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 доба росту).

Досліджувані дезінфекційні засоби мають різні діючі речовини та належать до різних груп.

Біодез (полігексаметиленгуанідин гідрохлорид — катіонна ПАР) за параметрами гострої токсичності при введенні в шлунок відноситься до 3-го класу помірно небезпечних речовин за ГОСТ 12.1.007-76 (ЛД₅₀ для мишей складає 950 мг/кг, для щурів — 815 мг/кг).

Хлорантоїн (дихлорантин, 5,5-диметилгідантоїн — хлорактивний дезінфектант третього покоління). Вміст активного хлору — не менше 13,5 %. Токсичність (ЛД₅₀) 1,3 хлорантину-, 5-диметилгідантоїну для щурів при введенні в шлунок становить 542 мг/кг.

Віркон С — (калію пероксисульфат) за рівнем токсичності відноситься до помірно небезпечних речовин (ЛД₅₀ для білих мишей при пероральному введенні становить 3680 мг/кг маси тварини).

Неохлор — (активно діючою речовиною є гіпохлорит натрію. Початковий вміст активного хлору в засобі від 7–9 % (концентрат). До складу засобу також входять мийні, антикорозійні, стабілізуючі, антимікробні, ароматизуючі добавки. Засіб у вигляді концентрату за ГОСТ 12.1.007–76 належить до 3 класу небезпеки. володіє слабким кумулятивним ефектом.

Для дослідження чутливості клітин до дезінфекційних препаратів суспензію клітин висаджували на 96-лункові планшети в концентрації 5×10^3 - 1×10^4 клітин/лунку в 100 мкл повного поживного середовища. Через 24 год. вносили досліджувані сполуки та інкубували клітини за стандартних умов 24 год., після чого фарбували клітини за допомогою МТТ та нейтрального червоного.

Фарбування МТТ. Після інкубації клітин протягом необхідного часу в кожному 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 °С в зволоженій атмосфері 3 год.; згодом 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 хв інкубації при кімнатній температурі визначали оптичну густину (ОГ) вмісту лунок при довжині хвилі 540 нм за допомогою мультилункового спектрофотометру Мультискан (Швеція). В 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, 6].

Тест з барвником нейтральним червоним. Після культивування клітин з досліджуваними сполуками в кожен лунку вносили середовище, яке містило 2 % барвник нейтральний червоний та інкубували протягом 3 год. у зволоженій атмосфері при 37 °С, потім видаляли супернатант та промивали клітини теплим фізіологічним розчином. Для фіксації клітин та елюації барвника з лізосом у кожен лунку додавали розчин для розчинення нейтрального червоного (1 % льодяної оцтової кислоти, 50 % етилового спирту, 49 % дистильованої води). Результати дослідження реєстрували за допомогою мультилункового спектрофотометру при довжині хвилі — 540 нм [8].

Результати й обговорення

Дані щодо цитотоксичності дезінфекційних засобів, отримані для різних культур клітин, були підтверджені у двох тестах (тест з барвником нейтральним червоним та МТТ), які не відрізнялися між собою за чутливістю (коефіцієнт кореляції — 0,9).

При порівнянні даних токсичності для культур клітин людини можна відзначити, що вони відрізняються від таких для лабораторних тваринах (табл.). Так, токсичність всіх дезінфекційних препаратів для культур клітин людини є вищою, ніж ЛД₅₀, отриманих на тваринах. Відомо, що моношар клітин є більш чутливими до дії токсикантів, ніж цілий організм.

Таблиця

Токсичність досліджуваних дезінфекційних препаратів (діючих речовин) in vivo та in vitro

Назва препарату	Вид тварин	Спосіб введення	ЛД ₅₀ мг/кг	IC ₅₀ (за даними наших досліджень), мг/л*		
				A-549	Клітини 293	HaCat
Біодез	щурі білі миші мурчаки	перорально	815±85 950±105 986±105	590±80	260±19,3	625±14,1
Віркон	білі щурі білі миші	перорально перорально	4120 3680	2876,018±16,	1914,06±34,5	793,03±27,2
Хлорантоїн	Щурі (3 хлорантину-, 5- диметилгідантоїн)	перорально	542	1031,618±13,	947,79±28,6	363±11,5
Неохлор				848,11±19,4	820,31±21,1	700,77±23,2

*Примітка:** — для більш наочного порівняння показників ЛД₅₀ та IC₅₀ цифрові значення останніх були виражені мг/л або мг/дм³

З досліджуваних культур клітин найбільш чутливими до віркону, хлорантоїну, неохлору є клітини шкіри та нирок, менш чутливими — культури клітин легеневого походження. Біодез проявляє більшу токсичність на клітини нирок, та приблизно однакову – на клітини шкіри та легеневого походження.

У статті [4] наведено дані щодо дослідження токсичності важких металів для людини та показано, що показники токсичності для тварин не відповідають таким для людини, одна і та ж речовина може бути менш токсичною для тварин та більш токсичною для людини як, наприклад, у випадку з сульфатом кадмію. Це підтверджують факти про те, що показники токсичності, отримані в досліді на тваринах, мало відображають реальну небезпеку хімічних речовин для людини. Разом з цим стає очевидним, що дані отримані на культурах клітин людини *in vitro*, більше відповідають справжнім показникам токсичності для людського організму. Таким чином, проведені дослідження показали, що дезінфекційні препарати для організму людини є більш токсичними, ніж для лабораторних тварин, що зумовлює необхідність подальших наукових досліджень та встановлення нормування залишкових кількостей дезінфекційних препаратів у продукції тваринного походження.

Висновки

1. Встановлено, що IC₅₀ на культурах клітин людини всіх досліджуваних дезінфекційних препаратів є вищими, ніж ЛД₅₀, отриманих на тваринах.

2. З досліджуваних культур клітин найбільш чутливими до віркону, хлорантоїну, неохлору є клітини шкіри та нирок, менш чутливими — культури клітин легеневого походження. Біодез проявляє більшу токсичність на клітини нирок, та приблизно однакову — на клітини шкіри та легеневого походження

Перспективи подальших досліджень. З метою розрахунків показників токсичності для людини дезінфекційних і мийно-дезінфекційних засобів рекомендуємо проводити дослідження з визначення цитотоксичності на культурах клітин людини.

L. V. Adamenko

THE TOXICITY OF DISINFECTANTS IN HUMAN CELL CULTURE IN VITRO

S u m m a r y

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 tissue various of origin (lung cells, epitheliocytes, kidney cells – A-549, HaCat). Two basic

tests were used in a comparative research for estimation of the amount of viable cells – MTT (methyl tetrasolium test) and NRU (neutral red uptake test).

Л. В. Адаменко

ТОКСИЧНОСТЬ ДЕЗИНФИЦИРУЮЩИХ СРЕДСТВ НА КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА IN VITRO

А н н о т а ц и я

С целью создания модели оценки токсичности веществ для человека *in vitro*, проведены эксперименты с использованием культур клеток человека различного тканевого происхождения (клетки рака легких, эпителия кожи, почек - A-549, HaCat, 293). В сравнительных исследованиях использованы два основных теста, по которым оценивали жизнеспособность клеток и их количество - метилтетразолиевый тест (МТТ) и окраска клеток нейтральным красным.

1. *Gennari A.* ECVAM Workshop 50: strategies to replace *in vivo* acute systemic toxicity testing / A. Gennari. — 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. — P.370

3. *Трахтенберг І. М.* Альтернативні методи і тест-системи / І. М. Трахтенберг, В. М. Коваленко, Н. В. Кокшарева та ін. — ВД «Авіцена», 2008. — 268 с.

4. *Трахтенберг І. М.* 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 / Трахтенберг І. М., Марченко М. Л., Безденежних Н. О., Кудрявець Ю. Й. (подана до друку)

5. *Scudiero D.* 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. — P. 4827–4833.

6. *Wilson A. P.* Cytotoxicity and Viability Assays in Animal Cell Culture: A Practical Approach, 3rd ed. (ed. Masters, J. R. W.) / Wilson A. P. // Oxford University Press. — Oxford, 2000. — Vol. 1.

7. <http://iccvam.niehs.nih.gov> — офіційний сайт ICCVAM.

8. *Штабський Б. М.* Ксенобіотики, гомеостаз і хімічна безпека людини / Б. М. Штабський, Гжегоцький М. Р. — Львів : Наутілус, 1999. — 308 с.

Рецензент: доктор ветеринарних наук, професор В. Б. Духницький.