

## НЕЗАРАЗНА ПАТОЛОГІЯ

УДК 57.083:615.28/9

### ЗАСТОСУВАННЯ АЛЬТЕРНАТИВНИХ МЕТОДІВ ВИЗНАЧЕННЯ ТОКСИЧНОСТІ ДЕЗІНФЕКЦІЙНИХ ЗАСОБІВ

***Л. В. Адаменко, кандидат ветеринарних наук, доцент***

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

***Цитотоксичність, IC50, культура клітин, метилтетразолієвий тест, фарбування нейтральним червоним.***

Ступінь токсичності ксенобіотиків (до яких належать 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 Б.М. Штабського (1999), мають 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 [3].

Американською агенцією з безпеки навколишнього середовища (EPA) затверджено 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 т/рік. За оцінками медичної дослідницької ради Великобританії, на програму необхідно у 11,5 млрд. доларів і на її реалізацію 40 років дослідницької роботи та понад 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. На токсикологічну оцінку одного пестициду необхідно до двох років та використання 10 000 тварин. За оцінками Британського союзу, що пропонує усунути вівісекції (BUAV), щорічно у світі для лабораторних експериментів використовують не менше 115 мільйонів тварин.

Метод визначення гострої токсичності за  $LD_{50}$  на тваринах, який є етапом санітарно-гігієнічного нормування, започатковано у світовій токсикологічній практиці ще з 1927 року, але за останні 80 років токсикологічних досліджень він жодного разу не був затверджений 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 за мету спричинити лише найменший токсикологічний ефект, а не загибель тварин. Сучасні дослідження на тваринах свідчать про 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) проаналізовані результати дослідів гострої токсичності у щурів та мишей для 50 хімічних речовин [1, 5, 7]. З них стало відомо, що показники  $LD_{50}$  для щурів корелюють достатньо високо з цим показником для мишей ( $R^2=0,88$ ), але  $LD_{50}$  для мишей та щурів має дуже низький коефіцієнт кореляції при обчисленнях 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 підкреслено, що чутливість людини до деяких хімічних речовин перевищує цей же показник у тварин у 2000 разів [Muller, 1948]. Такі ж результати наведено 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  $LD_{50}$  для тварин має дуже малу цінність.” Далі Lorke (1983) додає: «...доти, поки  $LD_{50}$  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» [5, 7]. У Європейській Директиві 86/09 сказано, що з розвитком науково обґрунтованих та практично доведених досліджень без використання тварин, у подальшому у санітарно-гігієнічному нормуванні буде скорочуватися кількість дослідів на тваринах.

Виходячи з того припущення, що дія хімічних речовин на живий організм перебігає 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 обчислення виявилися більш інформативними ( $R^2=0,83$ ) при обчисленні летальної дози для людини (протестовано 50 хімічних речовин) ніж прогнози, які базуються на значеннях  $LD_{50}$  для щурів та мишей ( $R^2=0,65$ ) (Ekwall et al., 1998). Регулююча інструкція та протоколи рекомендованих *in vitro* досліджень опубліковано ЕРА 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 [5, 7].

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.

**Мета дослідження** — дослідити дезінфекційні препарати *in vitro* на культурах клітин людини. За допомогою двох різних методів встановлено показник  $IC_{50}$  (концентрація речовини, що інгібує ріст або спричиняє загибель 50 % клітин *in vitro*). Отримані показники цитотоксичності для клітин людини проаналізовано з метою визначення їх відповідності небезпечним дозам, отриманим у дослідах на тваринах.

**Матеріали та методи дослідження** Досліджувані клітини A-549, НК, 293 (отримані з Банку клітинних ліній ІЕПОР ім.Р.Є.Кавецького НАН України) культивували у повному поживному середовищі RPMI 1640 ("SIGMA", США), що містить 4 ммоль/л L-глютаміну, 10 % ембріональної сироватки теляти ("SIGMA", США), 40 мкг/мл гентаміцину у зволоженій атмосфері з 5 %  $CO_2$  за 37°C на пластиковому посуді (SenteLab, Україна). Заміну середовища проводили кожні 2 доби. Пересів клітин здійснювали за допомогою розчину Версена за утворення 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 у шлунок належить до 3-го класу помірно небезпечних речовин за ГОСТ 12.1.007-76 ( $LD_{50}$  для мишей становить 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 ( $LD_{50}$ ) 1,3 хлорантину-, 5-диметилгідантоїну для щурів при введенні у шлунок становить 542 мг/кг.

Віркон С – (калію пероксисульфат) за рівнем токсичності належить до помірно небезпечних речовин ( $LD_{50}$  для білих мишей при пероральному введенні становить 3680 мг/кг маси тварини).

Неохлор – (активно діючою речовиною є натрію гіпохлорит. Початковий вміст активного хлору у засобі від 7–9 % (концентрат). До складу засобу також належать мийні, антикорозійні, стабілізуючі, антимікробні, ароматизуючі добавки. Засіб у вигляді концентрату за ГОСТ 12.1.007–76 належить до 3 класу безпеки, має слабкий кумулятивний ефект.

Для дослідження чутливості клітин до дезінфекційних препаратів суспензію клітин висаджували на 96-лункові планшети у концентрації  $5 \times 10^3$ – $1 \times 10^4$  клітин/лунку у 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 у кожну лунку 96-лункового планшета вносили по 10 мкл МТТ (3-[4,5-Dimetilthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue) (SIGMA, США) у концентрації 5 мг/мл та інкубували за 37 °С у зволоженій атмосфері 3 год; згодом планшет центрифугували (1500 об/хв протягом 5 хв), видаляли супернатант й додавали у кожну лунку по 50 мкл DMSO (диметилсульфоксид; SERVA) для розчинення кристалів формагану. Через 30 хв інкубації за кімнатної температури визначали оптичну густину (ОГ) вмісту лунок за довжини хвилі 540 нм за допомогою мультилункового спектрофотометра Мультискан (Швеція). Як контроль використовували порожні лунки та лунки з клітинами, у які не додавали ксенобіотик, а також контроль з розчинником – дистильованою, деіонізованою водою (1 %) у живильному середовищі для клітин [2, 8].

Тест з барвником нейтральним червоним. Після культивування клітин з досліджуваними сполуками у кожну лунку вносили середовище, яке містило 2 % барвник нейтральний червоний та інкубували протягом 3 год у зволоженій атмосфері за 37 °С, 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 досліду реєстрували за допомогою мультилункового спектрофотометра за довжини хвилі – 540 нм [3].

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

При порівнянні даних токсичності для культур клітин людини можна зазначити, що вони вирізняються від таких для лабораторних тваринах (табл.). Так, токсичність всіх дезінфекційних препаратів для культур клітин людини є вищою ніж ЛД<sub>50</sub>, отриманих на тваринах. Відомо, що моношар клітин є більш чутливими до дії токсикантів ніж загалом організм.

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

У статті [2] 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 із кадмію сульфатом. Це підтверджують факти про те, що показники токсичності, отримані у дослідах на тваринах, мало

відбивають реальну небезпеку хімічних речовин для людини. Разом з цим, стає очевидним, що дані, отримані на культурах клітин людини *in vitro*, більше узгоджуються із справжніми показниками токсичності для людського організму. Отже, проведені дослідження свідчать, 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.

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

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

\* -для більш наочного порівняння показників ЛД<sub>50</sub> та IC<sub>50</sub> цифрові значення останніх виражено у мг/л або мг/дм<sup>3</sup>

### Висновки

1. Встановлено, що IC<sub>50</sub> на культурах клітин людини всіх досліджуваних дезінфекційних препаратів є вищими ніж ЛД<sub>50</sub>, отриманих на тваринах.

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

3. Для розрахунків показників токсичності для людини дезінфекційних і мийно-дезінфекційних засобів рекомендуємо проводити дослідження з визначення цитотоксичності на культурах клітин людини.

### Список літератури

1. Альтернативні методи і тест-системи / [Трахтенберг І.М., Коваленко В.М., Кокшарева Н.В та ін.] К. ВД Авіцена, 2008 – 268 с.

2. 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 (подана до друку) / [Трахтенберг І.М., Марченко М.Л., Бездєнежних Н.О., Кудрявець Ю.Й.]

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

4. Evaluation of a Soluble Tetrasolium / Formazan assay for cell growth and drug sensitivity in Culture using human and other cell lines / Dominic A. Scudiero, Robert H. Shoemaker, Kenneth D. Paull [et al.] // Cancer Res – 1988 –Vol.48 – 4827–4833 p.

5. Gennari A. ECVAM Workshop 50: strategies to replace in vivo acute systemic toxicity testing / Gennari A. – 2004.

6. <http://iccvam.niehs.nih.gov> – офіційний сайт ICCVAM.

7. 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 N. 01-4499. – P.370

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

*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 HEK-293). В сравнительных исследованиях использованы два основных теста, по которым оценивали жизнеспособность клеток и их количество – метилтетразолиевый тест (МТТ) и окраска клеток нейтральным красным.*

***Цитотоксичность, IC<sub>50</sub>, культура клеток, метилтетразолиевый тест, окрашивание нейтральным красным.***

*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 HEK-293). 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).*

***Cytotoxicity, IC<sub>50</sub>, cell culture, metiltetrazol test, neutral red uptake.***