

## ДІАГНОСТИКА, ЛІКУВАННЯ ТА ПРОФІЛАКТИКА ХВОРОБ ТВАРИН

## DIAGNOSTICS, TREATMENT AND PROPHYLACTICS OF ANIMAL DISEASES

УДК 637.072:576.08

Адаменко Л. В., к.вет.н., доцент (adamenkolida@gmail.com) ©

Національний університет біоресурсів і природокористування України, м. Київ

### КІЛЬКІСНА ТОКСИКОЛОГІЧНА ОЦІНКА ХЛОРМІСТКИХ ДЕЗІНФЕКЦІЙНИХ ЗАСОБІВ *IN VITRO*

*Досліджено, що дезінфекційні хлормісткі засоби проявляють цитотоксичний ефект на культурах клітин і за рівнем цитотоксичності можна робити попередні висновки про клас токсичності при проведенні токсикологічної оцінки.*

**Ключові слова:** фармакологія, цитотоксичність, дезінфекційний засіб, безпека, оцінка

**Актуальність проблеми.** Сучасна стратегія тестування гострої токсичності хімічних речовин різного призначення, що дозволить значно скоротити кількість тварин і, зрештою, замінити їх в токсикологічних експериментах, ґрунтується на розвитку і вдосконаленні тестів *in vitro* з використанням різних клітинних культур і окремих одноклітинних організмів.

Перевагами альтернативних методів дослідження є поглиблення розуміння фізіологічних явищ, а також токсикологічної дії речовин шляхом розшифровки молекулярних і клітинних механізмів. Використання таких методів дає можливість виявляти мішені для дії речовин (рецептори, клітинні компоненти, структурні білки, специфічні ферменти, гени, чинники транскрипції тощо), які згодом можуть бути використані як маркери токсичності [1]. Впровадження методів *in vitro* дозволяє створювати велику кількість різноманітних експериментальних умов одночасно, отже, прискорювати і підвищувати надійність досліджень.

Через брак необхідних кінетичних параметрів досліджуваних речовин із метою прогнозування гострої токсичності іноді використовуються прямі порівняння показника ЛД<sub>50</sub> *in vivo* і ЕС<sub>50</sub>, отриманого в умовах *in vitro*. Для правильної оцінки дії критичної концентрації засобів *in vitro* рекомендується порівнювати її з критичною концентрацією в місці зв'язування з клітинами-

мішенями в умовах *in vivo*. Це обумовлено розходженням факторів, що впливають на біокінетику.

#### **Матеріал і методи дослідження.**

Дослідження токсичних властивостей дезінфекційних засобів *in vitro* проводили на культурах клітин людини: НК (нормальні кератиноцити шкіри людини), А-549 (культура епітеліоподібних клітин аденокарциноми легень людини), НТ-29 (епітеліоподібні клітини аденокарциноми товстого кишечника), НЕК 293 (клітини нирки ембріону людини).

У проведених дослідженнях були використані зареєстровані в установленому порядку дезінфекційні засоби, бланідас, неохлор, хлорантоїн, освітлений розчин хлорного вапна.

#### **Результати дослідження та їх обговорення.**

Експериментально нами доведено, що обрані тест-системи характеризуються різною чутливістю до негативного впливу досліджуваних речовин. Показники, отримані для різних культур клітин були порівняні з метою вивчення можливої специфічної дії дезінфекційних засобів та визначення органів-мішеней.

Неохлор найбільш токсичним у низьких концентраціях є для нормальних кератиноцитів шкіри людини та клітин клітин ниркового походження, дещо менш токсичним – кишкового походження. Найменш токсичним для клітин легеневого походження.

Бланідас більшу цитотоксичність проявляв на клітини лінії НТ-29, дещо меншу на – НЕК 293 та НК. Найменш токсичний для А-549.

Хлорантоїн для клітин ниркового, кишкового походження та нормальні кератиноцити шкіри є високотоксичним, а на клітини лінії А-549 – проявляв меншу токсичність.

Освітлений розчин хлорного вапна має значний токсичний вплив на всі досліджувані клітинні лінії.

Середньотоксична доза ( $IC_{50}$ ), за якої виживали і залишалися прикріпленими до поверхні 50 % клітин за результатами трьох тестів, становить: для бланідасу –  $594,82 \pm 36,78$  мкл/л, неохлору –  $603,7 \pm 49,55$  мкл/л, хлорантоїну –  $393,44 \pm 54,11$  мкл/л, освітленого розчину хлорного вапна –  $121,98 \pm 9,87$  мкл/л.

Середньотоксичні дози для культур клітин є нижчими, ніж середньолетальна доза для щурів та мишей за введення в шлунок. Це співпадає з результатами робіт інших вчених, які довели, що токсичність *in vitro* та *in vivo* (при введенні в шлунок) у більшості випадках мало корелюють між собою. Співвідношення  $TD_{50}/LD_{50}$  для різних засобів варіює у широких межах – від 1:1 до 1:400000 – тобто у більшості випадків культури клітин є більш чутливими до дії пестицидів, ніж лабораторні тварини, і не можуть дати адекватної відповіді при аналізі ступеня негативного впливу пестицидів на довкілля, здоров'я тварин і людини. У той же час вчені досить часто звертаються до, так званих, “альтернативних” методів дослідження токсичності пестицидів [2]. Методи *in vitro* дають можливість пояснювати біологічні явища, які зважаючи на

взаємодію різноманітних факторів важко вивчити в дослідах на тваринах; сприяють поглибленню розуміння токсичної дії речовин шляхом висвітлення молекулярних і клітинних механізмів.

Одночасно існують наукові праці, в яких доведено про високий кореляційний зв'язок між цитотоксичністю *in vitro* та токсичністю для лабораторних тварин при внутрішньочеревному введенні [3]. До наявності такого взаємозв'язку схиляються і інші науковці ІСВАМ [4].

Для доведення можливості дослідження токсичності дезінфекційних засобів на етапі попередньої токсикологічної оцінки та визначення органівмішеної токсичного впливу методами *in vitro* нами проведено порівняння показників токсичності *in vivo* для лабораторних тварин та отриманих результатів цитотоксичності *in vitro*. З метою більш наочного порівняння показники цитотоксичності наведені як показники отримані при внутрішньочеревному введенні лабораторним тваринам згідно класифікації токсичності речовин при введенні під шкіру та внутрішньочеревно (за К.К. Сидоровим) [1]. Окремі невідповідності між класами токсичності можна пояснити тим, що згідно класифікації небезпеки за ступенем впливу на організм за ГОСТ 12.1.007-76 речовини поділені на чотири класи небезпеки, а за класифікацією Сидорова К.К. на шість.

За параметрами токсичності за ГОСТ 12.1.007-76 досліджувані дезінфекційні засоби належать до 3 та 4 класу небезпеки. Так, неохлор (за класифікацією небезпеки згідно ГОСТ 12.1.007-76) належить до 3-го класу помірно небезпечних речовин, подразнює шкіру і слизові оболонки, володіє слабким кумулятивним ефектом, не виявляє сенсibilізуючої дії, не володіє мутагенними властивостями.

Згідно отриманих результатів неохлор за цитотоксичною дією на досліджувані культури клітин відноситься до четвертого класу небезпеки – малотоксичні речовини.

Хлорантоїн за параметрами гострої токсичності належить до третього класу помірно небезпечних речовин (ГОСТ 12.1.007-76). У сухому вигляді подразнює слизові оболонки очей та верхніх дихальних шляхів. В рекомендованих концентраціях для дезінфекції не володіє шкірно-подразнюючою та шкірно-резорбтивною дією, не проявляє сенсibilізуючих властивостей.

Результати дослідження цитотоксичної дії цього дезінфектанту дозволяють віднести його до четвертого класу небезпеки.

Хлорне вапно за параметрами гострого впливу належить до 3 класу небезпеки, а хлор який виділяється – до другого. Небезпечним є пил хлорного вапна та хлор, який виділяється (2-й клас небезпеки) володіють подразнюючою дією на слизові оболонки дихальних шляхів, а також на шкірні покриви. Небезпечним є при вдиханні, ковтанні, потраплянні на шкіру та слизові оболонки.

Хлорне вапно належить за показниками цитотоксичності до малотоксичних речовин.

Необхідно наголосити, що при визначенні цитотоксичності не можна отримати повних даних щодо токсичного впливу на весь організм. Саме цей випадок ми маємо при дослідженні хлорного вапна, оскільки ми не проводили дослідження мутагенності. При порівнянні даних, отриманих нами в експериментах та даних інших науковців щодо токсичності досліджуваних речовин можна відзначити певні розбіжності. Так, середньотоксичні дози для культур клітин (IC<sub>50</sub>) всіх досліджуваних дезінфекційних засобів є нижчими, ніж LD<sub>50</sub>, отриманих на тваринах (табл. 1.).

Дані щодо токсичності дезінфекційних засобів для лабораторних тварин нами було взяті з літературних джерел.

Таблиця 1

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

	LD <sub>50</sub> мг/кг (літературні дані)	IC <sub>50</sub>				IC <sub>50</sub> сеп
		A-549	НК	НЕК 293	HT-29	
Бланідас	>2000	816,43± 11,4	784,36± 51,8	514,20± 16,54	264,30 ± 25,12	594,82± 36,78
Неохлор	2540	1117,47 ±12,6	349,94± 47,5	353,94± 26,45	593,70± 33,86	603,7± 49,55
Хлорантоїн	542	693,26± 31,2	193,95± 19,6	396,76± 23,66	289,79± 30,85	393,44± 54,11
Хлорне вапно		106,28± 18,1	142,3± 14,8	–	117,35± 9,44	121,98± 9,87

\* - для більш наочного порівняння показників LD<sub>50</sub> та IC<sub>50</sub> цифрові значення останніх були виражені мг/л або мг/дм<sup>3</sup>.

Результати наших досліджень дозволяють констатувати, що цитотоксична дія дезінфекційних засобів різної хімічної природи носить стереотипний характер, який суттєво не залежить від хімічної структури засобу та клітинної лінії, яка використовується для дослідження (в межах класу ссавців).

Отримані нами дані повністю співпадають з гіпотезою загальної або базової токсичності, згідно якої більша частина сполук незалежно від хімічної природи порушує одні і ті ж важливі («базові») функції, загальні для всіх клітин незалежно від їх специфікації. Пошкодження одного метаболічного шляху або однієї субклітинної структури поступово поширюється на інші функції/структури.

**Висновки.** На підставі проведених досліджень можна зробити узагальнення: за результатами цитотоксичного впливу на культури клітин людини можна робити попередні висновки щодо токсичності речовини на етапі скринінгу хімічних речовин для певних цілей, попереднього гігієнічного нормування тощо та встановлювати органи-мішені токсичного впливу.

Слід зауважити, що при встановленні належності до класу токсичності речовин неможливо керуватися лише даними, отриманими за цитотоксичним ефектом. Необхідно як і при проведенні токсикологічних досліджень на

лабораторних тваринах враховувати результати інших досліджень, в тому числі мутагенного впливу тощо.

### Література

1. Доклінічні дослідження ветеринарних лікарських засобів / За ред. І.Я. Коцюмба. – Львів : Тріада плюс, 2005. – 356 с.
2. Еропкин М.Ю. Модели, альтернативные использованию лабораторных животных в токсикологии. Достижения и проблемы/ Еропкин М.Ю. // Токсикологический вестник. – 1999. – № 5. – С. 7 – 13.
3. Barile F.A., Cardona M. Acute cytotoxicity testing with cultured human lung and dermal cells. In Vitro Cell // Dev. Bid. Anim. – 1998. – Vol. 34. – P. 631 – 635.
4. 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

### Summary

*It was established that the results of experiments in vitro can be used for preliminary views on the matter at the toxicity screening stage of chemicals for making disinfectants, previous hygienic regulation, etc. and target organs of toxicity from disinfection materials were set.*

Рецензент – д.вет.н., професор Гуфрій Д.Ф.