

Министерство здравоохранения Республики Беларусь

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», Научно-исследовательская часть

Перспектива применения технологии клеточных культур для целей *in vitro*-токсикологии

*Докладчик: заведующий лабораторией экспериментальной
медицины, фармакологии и токсикологии, к.м.н, Павлов Кирилл
Игоревич*

Минск, 2019

In vitro-токсикология – альтернатива и дополнение к исследованиям на животных

In vitro-токсикология – новое направление токсикологических исследований.

В in vitro-токсикологии вместо лабораторных животных в качестве тест-объектов используют культуры клеток и тканей.

In vitro-токсикология интенсивно внедряется в санитарно-гигиеническую экспертизу и доклинические исследования лекарственных средств (*S.M. Jane, P.K. Saxena, 2009*).

В Республике Беларусь исследования в области альтернативной in vitro-токсикологии выполнялись с целью санитарно-гигиенической оценки токсичности антропогенных химических факторов (*В.В. Шевляков, С.И. Сычик, Е.В. Дроздова, Н.В. Дудчик, Е. К. Власенко, 2016-2018*).

In vitro-тестирование ксенобиотиков на данный момент широко не распространено.

Преимущества *in vitro*-токсикологии

1. Возможность использовать в качестве тест-объектов широкий спектр культур клеток и тканей как млекопитающих, так и человека;
2. Возможность моделировать орano- и тканетоксические эффекты;
3. Возможность использовать одновременно большое количество доз и токсикантов;
4. В сравнении со стандартными исследованиями на животных – использование культур клеток является менее затратным;
5. Исследования на культурах клеток по своей сути – гуманны и не связаны со страданием лабораторных животных и психологическим дискомфортом у исследователя (*А.П. Еськов, Р.И. Каюмов и соавт., 1989-2010; Н.М. Дмитруха, 2009-2013; И. М. Трахтенберг и соавт., 2008; Г. О. Гаспарян и соавт., 2005-2009*).
6. Возможность экстраполяции данных, полученных *in vitro* на тест-объекты *in vivo* (*В. Ekwall et al., 1983-1993*).

Цель исследования

Цель исследования – оценить токсические эффекты химических веществ и лекарственных средств и на культуры кератиноцитов HaCaT и мононуклеарных лейкоцитов.

Задачи :

- 1) предложить методику эффективной оценки токсического эффекта химических веществ и лекарственных средств на данные культуры клеток;
- 2) сопоставить результаты, полученные в экспериментах *in vivo* и *in vitro*.
- 3) сравнить токсические эффекты для культур клеток HaCaT с токсическими эффектами для культур клеток мононуклеарных лейкоцитов.

Тест-объекты

Кератиноциты
HaCaT

Мононуклеарные
лейкоциты

Кератиноциты HaCaT

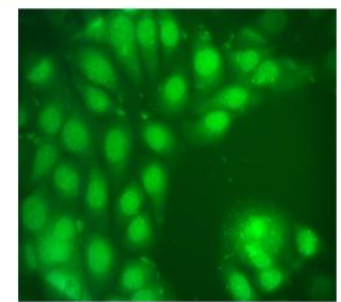
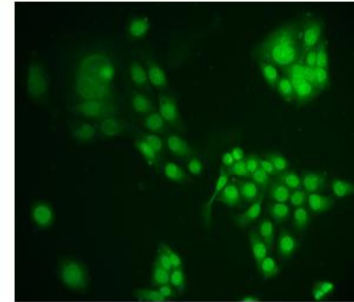
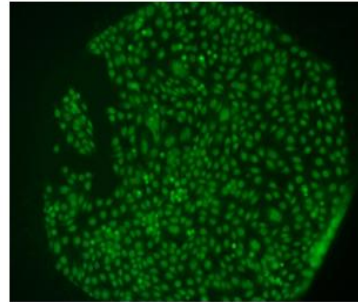
Кератиноциты HaCaT

Клетки HaCaT являются иммортализованными кератиноцитами взрослого человека.

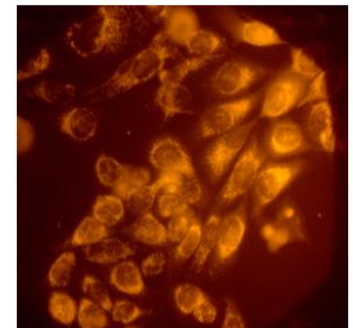
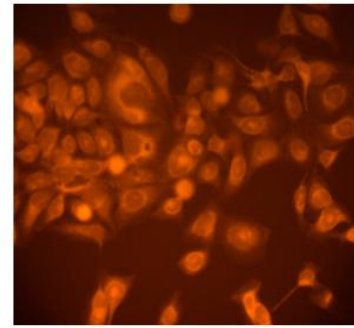
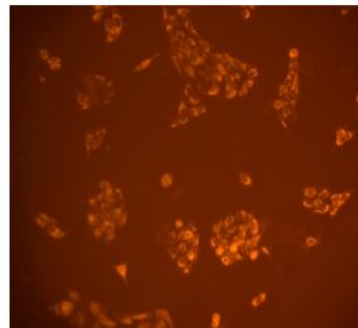
Культура HaCaT является высокодифференцированной клеточной линией, экспрессирующей основные факторы кератиноцитов (кератины, инволукрин, филагрин).

Культура HaCaT относительно неприхотлива и удобна для стандартных условий культивации.

Окраска акридиновым жёлтым: выявление ядра и цитоплазмы



Окраска пиронином Б: выявление РНК



Моноклеарные лейкоциты

Моноклеарные лейкоциты – это эффективная модель для оценки воздействия ксенобиотиков и учёта их токсических эффектов. Лимфоциты и моноциты обладают широким спектром экспрессируемых генов рецепторов к цитокинам, гормонам и нейромедиаторам. У лабораторных животных дополнительным источником большого количества моноклеарных лейкоцитов является селезёнка.

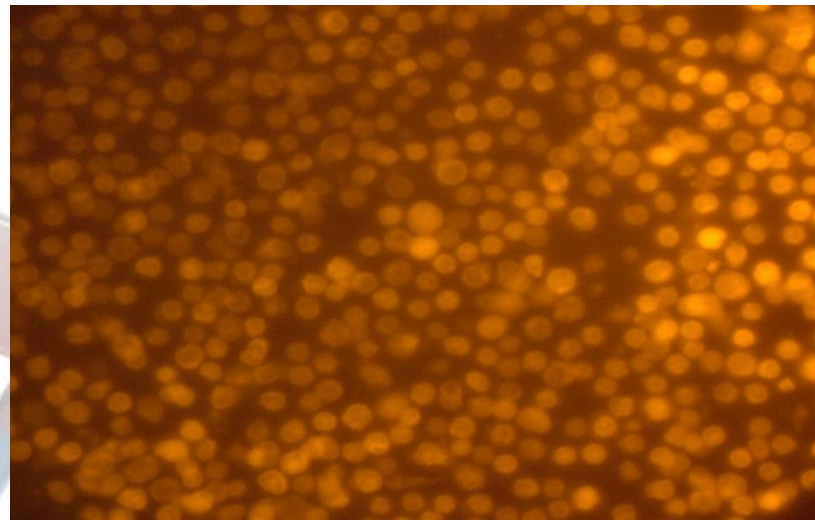


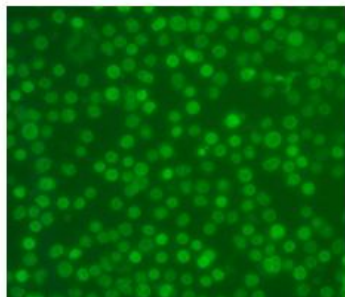
Рисунок – Микрофотография концентрированной культуры моноклеарных лейкоцитов, полученных из селезёнки крысы. Окраска Родамином Ж

Методика исследования

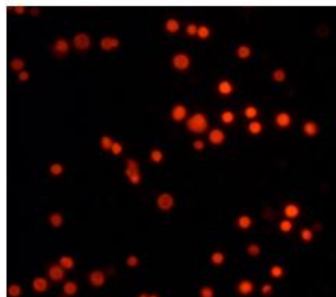
- Культуры клеток кератиноцитов HaCaT предварительно культивировались 3 суток в среде MEM с добавлением L-глутамина и сыворотки эмбрионов телят до достижения количества 600 тысяч клеток на 1 лунку 24-х луночного планшета.
- Популяции мононуклеарных лейкоцитов были получены из селезёнки крысы Wistar путём центрифугирования в градиенте урографин-фиколл.
- Токсикологический эксперимент выполнялся следующим образом: к клеткам в лунки планшета добавляли токсикант в необходимой концентрации, инкубировали в термостате требуемое время при температуре 37°C, добавляли красители для микроскопии.
- Токсиканты с культурой клеток кератиноцитов HaCaT инкубировали 24 часа, с культурой клеток селезёнки – 1 час.
- Проводилась световая и флуоресцентная микроскопия при помощи микроскопа ZEISS Axio Vert.A1. с использованием красителей пропидия йодида и акридинового жёлтого.

Материалы и методы

Токсикологический эксперимент и подготовка микрофотографий

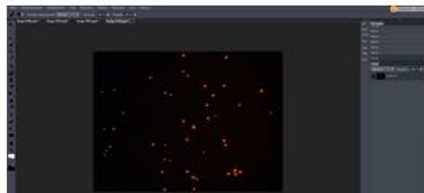


Окраска акридиновым жёлтым для подсчёта общего числа клеток



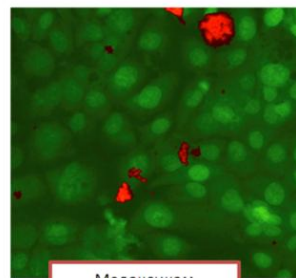
Окраска йодидом пропидия для подсчёта мёртвых клеток

Подсчёт клеток в графическом редакторе

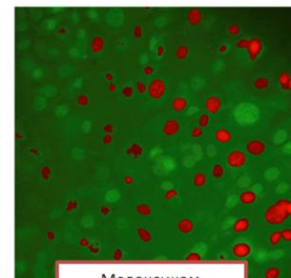


Выводы о токсическом эффекте
in vitro

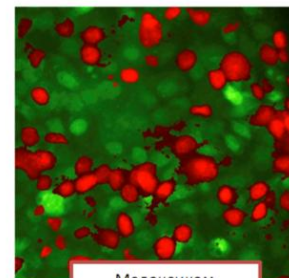
- В основу оценки токсичности было положено свойство красителя пропидия йодида связываться с ДНК, что возможно только в мертвой клетке вследствие нарушения барьерной функции плазмалеммы и кариолеммы.
- Таким образом, клетки, активно инкорпорирующие пропидий йодид, ярко окрашенные при флуоресцентной микроскопии, считались мертвыми.



Мелоксикам
0,4 мг/мл



Мелоксикам
4,3 мг/мл



Мелоксикам
4,7 мг/мл

Используемые токсиканты

Токсикант	Характеристика
Химические вещества	
Этанол	Одноатомный спирт. Стандартный референсный токсикант. Экспериментальное моделирование интоксикации этанолом у животных выполнялось достаточно часто. Исследования на культурах клеток не так многочисленны.
Изопропанол	Одноатомный спирт. Стандартный референсный токсикант.
Сапонин	Сапонины – сложные органические соединения гликозидной природы. Главное свойство сапонинов, которое используется в технологии культур клеток – повышение сапонами проницаемости биомембран.
Лекарственные средства	
Мелоксикам	Мелоксикам — нестероидное противовоспалительное средство. Как и у других НПВС, его использование связано с повышенным риском сердечно-сосудистых событий, таких как сердечный приступ и инсульт, желудочно-кишечных кровотечений.
Цефазолин	Цефазолин – антибиотик I поколения из группы цефалоспоринов. Среди побочных эффектов цефазолина выделяют аллергические реакции, судороги, лейкопению, нейтропению, гемолитическую анемию, расстройства ЖКТ, дисбактериоз.

Результаты: воздействие этанола на кератиноциты HaCaT

Кератиноциты HaCaT

Оценку активности токсикантов осуществляли с помощью пробит-анализа – вычислены летальные концентрации (LC_{16} , LC_{50} , LC_{84} , LC_{100}). Величины доз, характеризующих минимальный эффект гибели (пороговая концентрация – LC_{10}), вызывающих летальный эффект у большинства клеток (LC_{90}), и минимальной абсолютно летальной концентрации (LC_{99}). Кроме того, вычисляли коэффициенты, характеризующие степень токсичности: **индекс летальности (ИЛ)**, как отношение LC_{99} к LC_{10} , и коэффициент наклона прямой «доза – эффект» (КН).

Наблюдаемые токсические эффекты отмечались через 24 часа.

Таблица 1 – Сводные показатели токсичности этанола для культуры кератиноцитов HaCaT, в зависимости от концентрации (С)

С, мг/мл	Мёртвые клетки/ все клетки (%)	LC_{10} , мг/мл	LC_{16} , мг/мл	LC_{50} , мг/мл	LC_{84} , мг/мл	LC_{90} , мг/мл	LC_{99} , мг/мл	КН	ИЛ
8 (1%)	10/100	16,5	22,6	48,6	74,5	78,80	104,20	0,53	6,33
19 (2%)	13/100								
27 (3%)	24/100								
38 (5%)	25/100								
55 (7%)	34/100								
62 (8%)	84/100								
72 (9%)	96/100								



Особенности воздействия этанола на культуры клеток селезёнки крысы

Мононуклеарные лейкоциты

Таблица 2 – Сводные показатели токсичности этанола

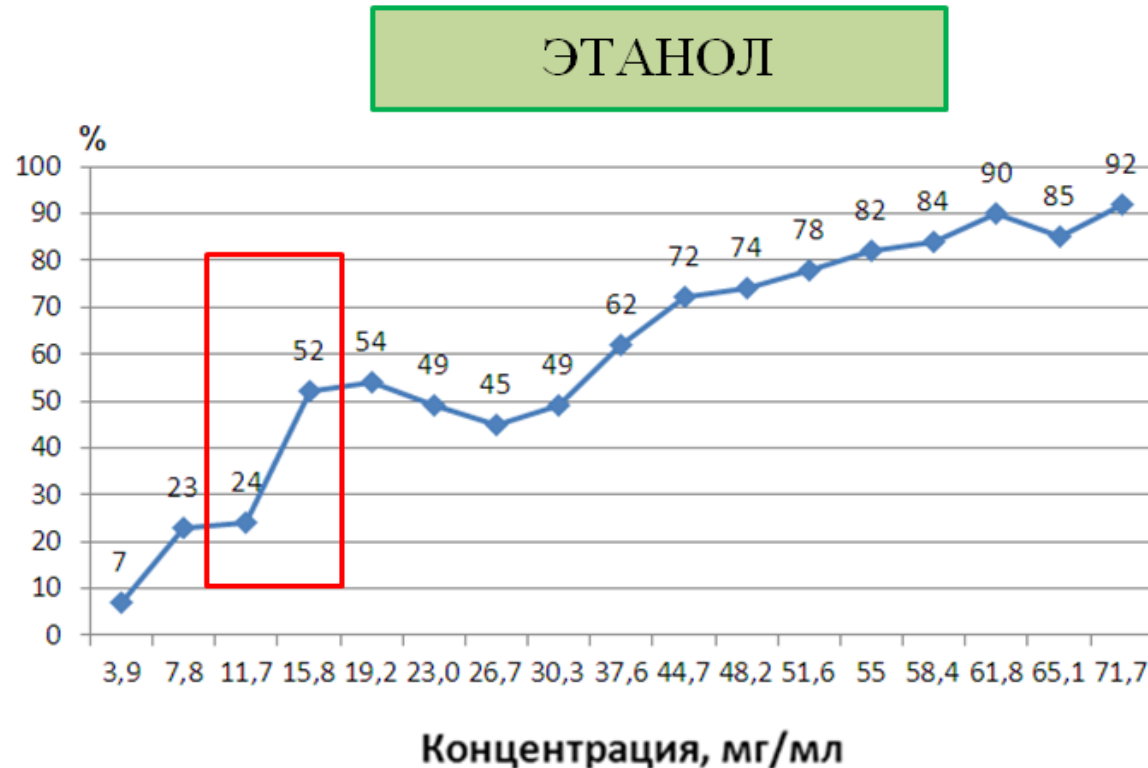
Доза, мг/мл	Летальность , n погибших/ n животных в группе	Летальная концентрация, мг/мл						КН	ИЛ
		LC ₁₀	LC ₁₆	LC ₅₀	LC ₈₄	LC ₉₀	LC ₉₉		
3,9 (0,5%)	7/100	0,13	3,7	27,3	58,3	66,4	98,0	1,14	8,81
7,8 (1%)	23/100								
11,7 (1,5%)	24/100								
15,8 (2,0%)	52/100								
19,2 (2,4%)	54/100								
23,0 (2,9%)	49/100								
26,7 (3,4%)	45/100								
30,3 (3,8%)	49/100								
37,6 (4,8%)	62/100								
44,7 (5,7%)	72/100								
48,2 (6,1%)	74/100								
51,6 (6,5%)	78/100								
55,0 (7,0%)	82/100								
58,4 (7,5%)	84/100								
61,8 (7,8%)	90/100								
65,1 (8,3%)	85/100								
71,7 (9,1%)	92/100								



Особенности воздействия этанола на культуры мононуклеарных лейкоцитов

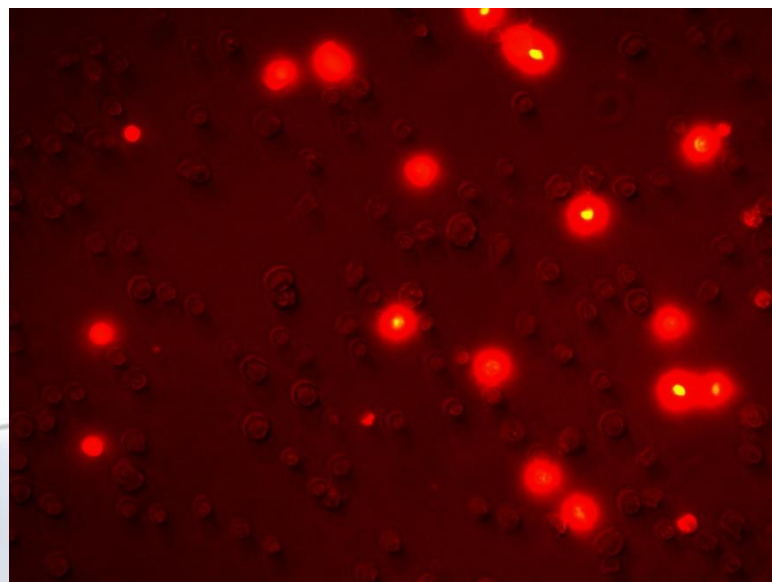
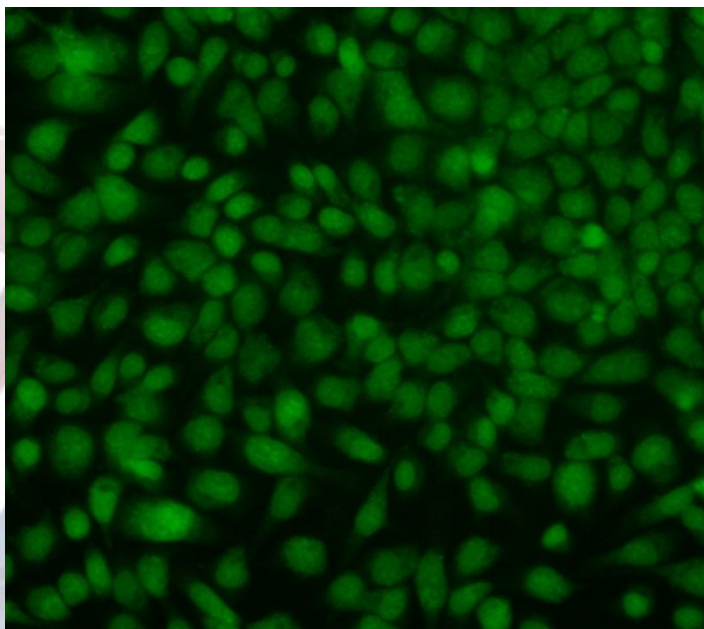
Мононуклеарные лейкоциты

Как и у кератиноцитов HaCaT был выявлен интенсивный рост летальности на кривой «доза-эффект». Однако, вызывалось данное явление меньшими концентрациями этанола (15,8 мг/мл, или 2%).



Сравнение токсических эффектов

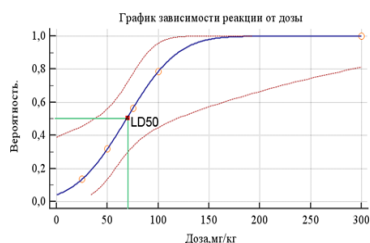
Характеристика токсического эффекта	Кератиноциты HaCaT	Мононуклеарные лейкоциты
Достижение интенсивной летальности	24 часа	1 час
Диапазон LC ₁₆ - LC ₈₄	22,6 – 74,5 мг/мл (2% - 9%)	3,7 – 58,3 мг/мл (0,5% - 7,5%)
Точка роста летальности	62,0 мг/мл (8%)	15,8 мг/мл (2%)
Расчётное значение LC ₅₀	48,6 мг/мл	27,3 мг/мл
Изменение морфологии	Округление и уменьшение клеток	Нет



Токсичность лекарственного средства мелоксикам

In vivo – экспериментальные исследования на лабораторных животных

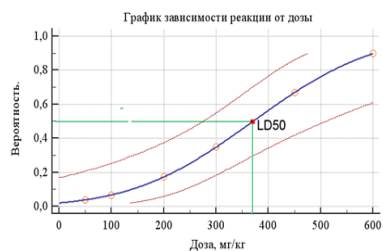
Крысы-самцы



$LD_{50}=64,2 \pm 38,62$ мг/кг

ИЛ=9,0

Мыши-самцы

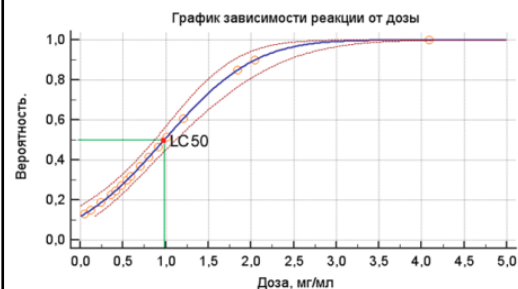


$LD_{50}=384,8 \pm 62,50$ мг/кг

ИЛ=5,7

In vitro – экспериментальные исследования на культурах клеток

Кератиноциты HaCaT



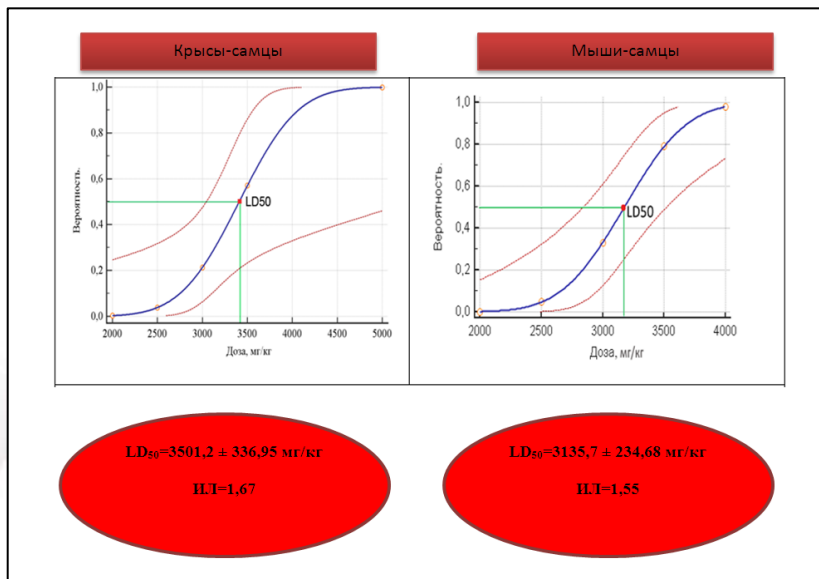
$LC_{50}=0,98 \pm 0,32$ мг/кг

ИЛ=34,14

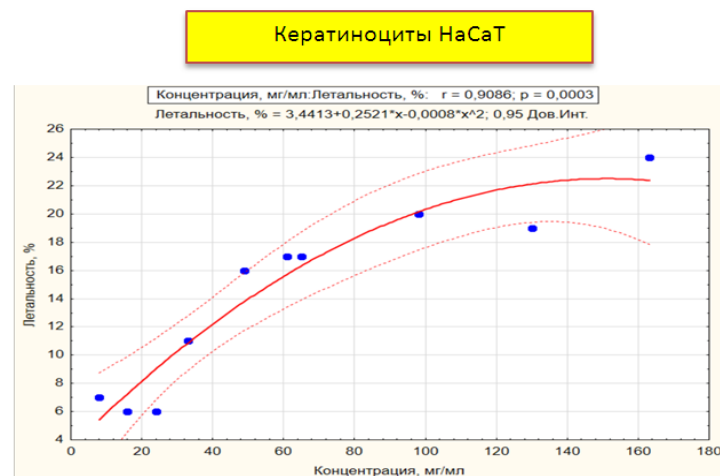
Доза, мг/мл	Летальная концентрация, мг/мл						КН	ИЛ
	LC ₁₀	LC ₁₆	LC ₅₀	LC ₈₄	LC ₉₀	LC ₉₉		
0.05								
0.12								
0.24								
0.36								
0.41								
0.48								
0.54								
0.59								
0.70	0,0853	0,1306	0,9828	1,8350	2,0438	2,9117	0,87	34,14
0.80								
0.91								
1.01								
1.21								
1.84								
2.04								
4.09								

Токсичность лекарственного средства цефазолин

In vivo – экспериментальные исследования на лабораторных животных



In vitro – экспериментальные исследования на культурах клеток



При использовании концентраций от 20 до 160 мг/мл летальность не превышала 24%

Токсические эффекты in vivo

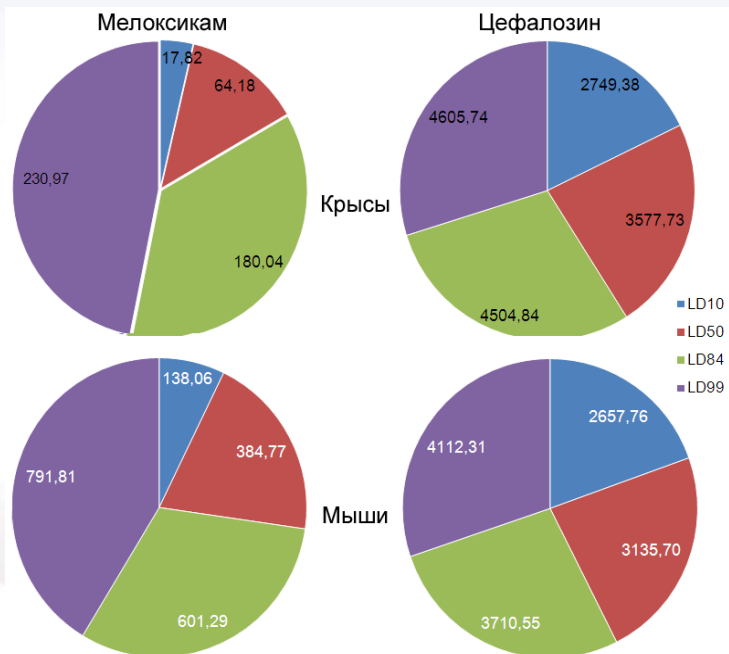
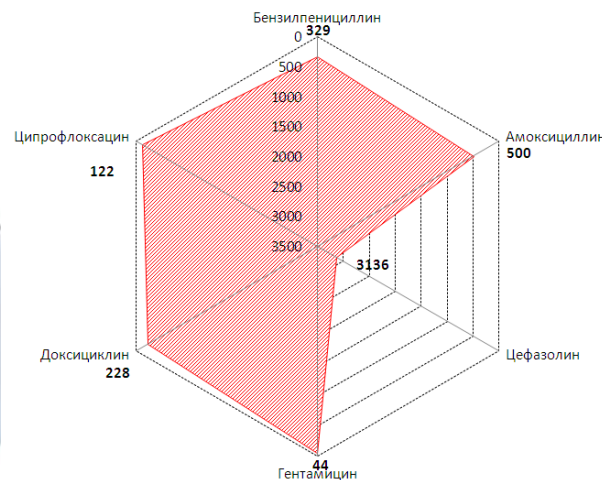


Таблица – Показатели LD₅₀ для мышей при внутривенном и внутрибрюшинном введении антибиотиков

Наименование	LD50 для мышей в/в введение, мг/кг	Класс токсичности в соответствии с классификацией OECD
Бензилпенициллин	329	5 (практически нетоксично)
Амоксициллин	500	5 (практически нетоксично)
Цефазолин	3136	6 (относительно безвредно)
Гентамицин	44	4 (малотоксично)
Доксициклин	228	4 (малотоксично)
Ципрофлоксацин	122	4 (малотоксично)



Результаты: особенности воздействия других токсикантов на кератиноциты HaCaT

Кератиноциты HaCaT

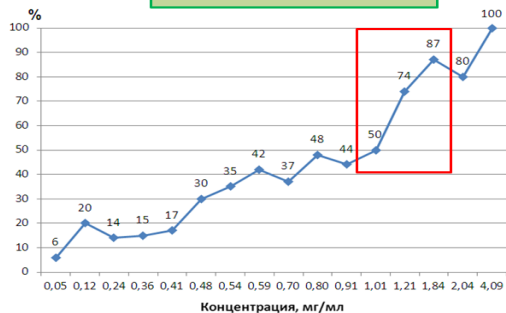
ЭТАНОЛ



Диапазон токсических концентраций для этанола LC₁₆ - LC₈₄ находился на уровне 22,6 – 74,5 мг на 1 мл среды, в которой находилось не менее 600 тыс. кератиноцитов. Это соответствовало 2% - 9% растворам этанола в культуральной среде.

Наращение гибели клеток не характеризовалось линейным ростом зависимости от концентрации, а было связано с резким повышением летальности при достижении концентрации 62 мг/мл (8%).

МЕЛОКСИКАМ



САПОНИН



Выводы

Культура клеток
иммортиализированных
кератиноцитов HaCat являлась
эффективной тест-моделью для
оценки токсического эффекта по
следующим причинам:

1) возможность суммарно
исследовать некроз и апоптоз
клеток;

2) токсиканты вызывали
изменение морфологии клеток -
снижался объём цитоплазмы,
наблюдалось уменьшение и
округление клеток.

Культура
мононуклеарных лейкоцитов,
полученная из селезёнки
крысы, являлась
эффективной тест-моделью
для оценки токсического
эффекта по следующим
причинам:

1) однородность клеточного
состава;

2) простота подсчёта живых
и мёртвых клеток.

3) быстрое наступление
токсического эффекта.

Заключение и перспективы исследований

In vitro-токсикология имеет большой экспериментальный потенциал и практическую актуальность.

Необходимы исследования, объясняющие цитотоксичность этанола на субклеточном и молекулярном уровнях для большого спектра культур клеток. Требуется исследование повреждающего действия на биомембраны, митохондрии, цитоскелет.

Перспективным является широкое применение методов иммуногистохимии.

Флуоресцентная микроскопия позволяет эффективно решить данные задачи. Предложенная методика оценки токсического эффекта проста в использовании и наглядна.

**Благодарю за
внимание!**