

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ IN VITRO ДЛЯ ПРОГНОЗА ТОКСИЧНОСТИ И МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ МИКОТОКСИНОВ

Горшенин А.В., Куликова С.А., Антонов В.А.

*Федеральное государственное унитарное предприятие
«Научно-исследовательский институт гигиены, токсикологии и профпатологии»
Федерального медико-биологического агентства
400048, г. Волгоград, ул. Землячки, 12
телефон/факс: (8442) 78-62-57
e-mail: niigtp@rihtop.ru, gorshenin@rihtop.ru*

Резюме. В работе проведена оценка возможности прогнозирования токсикометрических параметров некоторых микотоксинов для человека по совокупности показателей острой токсичности, полученных на животных, и значений цитотоксичности для культур лимфоцитов лабораторных животных и человека. Оценено изменение уровня апоптоза лимфоцитов крыс и человека под воздействием микотоксинов, а также влияние на этот процесс веществ, изменяющих обмен кальция в клетках.

Ключевые слова. Апоптоз, лимфоциты, микотоксины, токсичность, цитотоксичность

USING IN VITRO METHODS FOR PREDICTING TOXICITY AND MECHANISMS OF ACTION OF MYCOTOXINS

Gorshenin A.V., Kulikova S.A., Antonov V.A.

*Federal State Unitary Enterprise «Research Institute of Hygiene, Toxicology and Occupational
Pathology» of Medical and Biological Agency,
Russia, 400048, Volgograd, Zemlyachka str., 12
e-mail: gorshenin@rihtop.ru*

Summary. The paper assesses the possibility of predicting the toxicometric parameters of some mycotoxins for humans based on a set of acute toxicity indicators obtained on animals and cytotoxicity values for lymphocyte cultures of laboratory animals and humans. A change in the level of apoptosis of rat and human lymphocytes under the influence of mycotoxins, as well as the effect of substances changing calcium metabolism in cells on this process, was assessed.

Keywords. Apoptosis, lymphocytes, mycotoxins, toxicity, cytotoxicity

Введение. В настоящее время существенное значение в исследовании токсичности различных классов химических веществ приобретают методы с использованием культур клеток и тканей [1–3]. Подобный подход является достаточно популярным, так как позволяет значительно экономить время и уменьшить количество используемых в эксперименте лабораторных животных. Важным преимуществом данного способа оценки токсичности заключается в возможности работы с культурами клеток и тканей человека, в то время как большинство токсикологических исследований и изучение механизма действия токсикантов на человеческом организме невозможны. Большое внимание исследователей в данном направлении привлекают лимфоциты. Это связано как с высокой чувствительностью клеток иммунной системы к воздействию химических соединений, так и с возможностью достаточно простого получения этих клеток как у лабораторных животных, так и у человека.

Среди многочисленных негативных воздействий окружающей среды все большее беспокойство вызывают токсиканты природного происхождения. Значительную опасность представляют токсичные продукты жизнедеятельности микроскопических грибов – микотоксины – вторичные метаболиты несовершенных грибов, обладающие выраженным действием на организм животных и человека [4-6]. Многие из них угнетают деятельность жизненно важных систем организма, обладают отдаленными эффектами (мутагенным, тератогенным, канцерогенным) [4, 5].

Проблема микотоксикозов является одной из важнейших для сельского хозяйства большинства стран. Так, по данным ФАО, около четверти мирового производства зерна поражено микотоксинами; 36% всех болезней растений и хранящихся продуктов урожая связано с действием микотоксинов [6].

Целью настоящей работы является оценка возможности прогнозирования токсикометрических параметров микотоксинов для человека по совокупности показателей острой токсичности, полученных на животных, и значений цитотоксичности для культур лимфоцитов лабораторных животных и человека, а также исследование вклада апоптоза в развитие интоксикации данными соединениями.

Материалы и методы. В работе использованы афлатоксин В₁ фирмы «Serva», Т-2 токсин и охратоксин А фирмы «Sigma».

Эксперименты проведены на нелинейных белых мышах и белых нелинейных крысах. При работе с экспериментальными животными руководствовались требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу МЗ СССР от 12.08.1977 г. № 755), а также «Руководства по содержанию и использованию лабораторных животных» [7]. Помимо этого, для

определения цитотоксичности исследуемых соединений использовали кровь здоровых доноров, отобранную в асептических условиях.

Оценка цитотоксических свойств микотоксинов на культурах лимфоцитов лабораторных животных и человека проводилась в опытах *in vitro*. Селезенку экспериментальных животных выделяли в стерильных условиях, клеточную суспензию получали в гомогенизаторе Поттера. Лимфоциты из периферической крови и селезенки выделяли в градиенте плотности по *Boyum* [8]. Рабочая концентрация лимфоцитов крови человека и спленоцитов экспериментальных животных составила 2×10^6 клеток в 1 мл. Количество жизнеспособных клеток - не менее 95%. Культивирование клеток проводили в 96-луночных планшетах в среде RPMI1640 с добавлением 10% фетальной сыворотки, 2мМ L-глутамина, 100 мкг/мл гентамицина и 2×10^{-5} М 2-меркаптоэтанола в течение 68 часов в атмосфере, содержащей 5% CO₂ при 100% влажности. Затем в культуры добавляли изучаемые соединения в различных концентрациях. Инкубация культур клеток с исследуемыми веществами составляла 4 часа. В последующем в каждую лунку добавляли тетразолиевую соль МТТ (бромид 3-(4,5-диметил-тиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолия), который способен восстанавливаться митохондриальными ферментами живых клеток до МТТ-формазана. Среднеэффективную концентрацию (EC₅₀) определяли фотометрическим методом по интенсивности окрашивания культур лимфоцитов с оцениваемыми токсикантами по сравнению с контрольными культурами, содержащими только растворитель, в качестве которого использовали диметилсульфоксид, разведенный культуральной средой до 1% концентрации, которая, как было предварительно установлено, не влияет на гибель лимфоцитов в культуре. Среднесмертельную дозу исследуемых токсикантов при их внутривенном введении (LD₅₀) оценивали на 14 сутки с момента введения. Величины EC₅₀ и LD₅₀ рассчитывали пробит-методом по соответствующей программе, анализ корреляции между значениями EC₅₀ и LD₅₀ проводили в программе Statistica for Windows, версия 10.

При исследовании апоптоза культивирование клеток производили по аналогичной описанной выше методике с добавлением в исследуемые культуры Т-клеточного митогена фитогемагглютинина (ФГА) и В-клеточного митогена – липополисахарида кишечной палочки (ЛПС). Уровень апоптоза в лимфоцитах оценивали морфологически в мазках клеток, окрашенных ядерным красителем метиленовым зеленым.

Результаты и обсуждение. Данные по цитотоксическим свойствам изученных соединений представлены в таблице 1. Из представленных в таблице данных видно, что наибольшей токсичностью для культур лимфоцитов лабораторных животных и человека обладает Т-2 токсин.

Таблица 1 - Цитотоксические свойства микотоксинов для лимфоцитов млекопитающих

Исследуемые соединения	Концентрация, вызывающая 50% угнетение синтеза ДНК, ЕС ₅₀ , мг/мл		
	Мыши нелинейные	Крысы нелинейные	Человек
Т-2 токсин	$1,4 \times 10^{-7}$	$5,9 \times 10^{-7}$	$1,1 \times 10^{-7}$
Афлатоксин В ₁	$4,0 \times 10^{-4}$	$7,5 \times 10^{-4}$	$2,3 \times 10^{-4}$
Охратоксин А	$5,0 \times 10^{-2}$	$2,1 \times 10^{-1}$	$1,2 \times 10^{-5}$

Значительно меньшие цитотоксические свойства по отношению к культурам лимфоцитов наблюдаются у афлатоксина В₁. При анализе цитотоксичности охратоксина А установлено, что лимфоциты человека на несколько порядков чувствительнее, чем спленоциты лабораторных животных.

В таблице 2 представлены показатели острой токсичности исследованных микотоксинов для лабораторных животных при внутривенном введении. Из приведенных данных видно, что для млекопитающих более токсичны Т-2 токсин и афлатоксин В₁.

Таблица 2 – Острая токсичность микотоксинов для млекопитающих при внутривенном введении

Исследуемые соединения	LD ₅₀ , мг/кг	
	Мыши нелинейные	Крысы нелинейные
Т-2 токсин	4,92 (2,59...8,48)	0,97 (0,59...1,62)
Афлатоксин В ₁	4,11 (3,10...8,20)	1,58 (1,09...6,11)
Охратоксин А	27,65 (21,01...36,30)	17,48 (10,66...28,49)

Важным аспектом использования полученных в ходе исследований *in vitro* результатов по чувствительности клеточных культур является возможность прогнозирования на их основе токсичности исследуемых соединений и механизмов их токсического действия для человека. При этом на основе полученных *in vitro* данных по цитотоксичности токсикантов для культур лимфоцитов животных и человека и результатов их токсикологической оценки *in vivo* могут быть получены математические модели прогноза токсичности изучаемых соединений для человека. Пример подобного расчета приведен на рисунке 1, где описана зависимость между ЕС₅₀ и LD₅₀ Т-2 токсина.

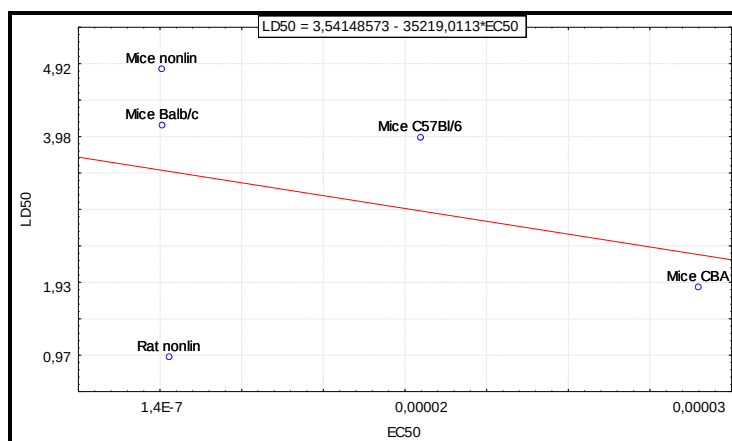


Рисунок 1 - Зависимость между острой токсичностью и цитотоксичностью Т-2 токсина

Вычисленная по приведенному на рисунке 1 уравнению LD_{50} Т-2 токсина для человека при внутривенном введении составляет 3,537 мг/кг. Аналогичные расчеты были проведены для охратоксина А. Расчетные среднесмертельные дозы этих веществ для человека и уравнения регрессии, полученные на основании исследований *in vitro* и *in vivo* представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Расчетные параметры LD_{50} исследованных токсикантов для человека

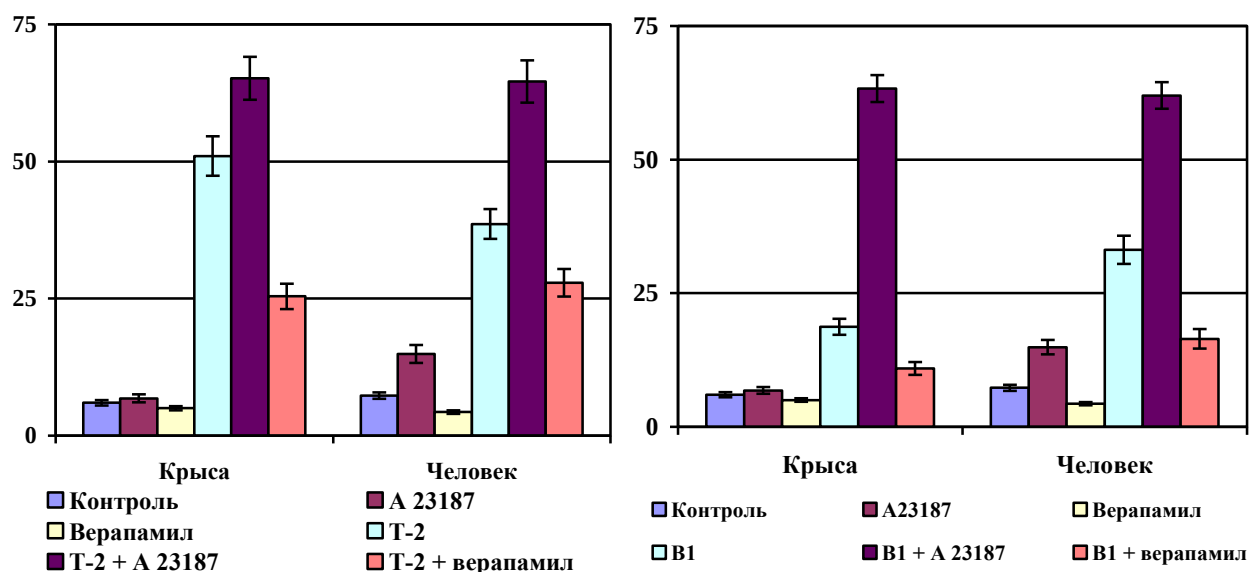
Исследуемые соединения	Расчетная величина LD_{50} , мг/кг	Уравнение регрессии
Т-2 токсин	3,537	$LD_{50} = 3,5415-35219,01 \times EC_{50}$
Охратоксин А	4,116	$LD_{50} = 4,1167-23,39 \times EC_{50}$
Афлатоксин В ₁	5,366	$LD_{50} = 7,1448-7734,6939 \times EC_{50}$

Одним из важных механизмов формирования ответа организма на экзогенные воздействия является изменение интенсивности программированной гибели клеток (апоптоза) различных органов и систем [9–11]. Экспериментально установлено, что в механизме развития гибели лимфоцитов при воздействии микотоксинов существенную роль играет апоптоз (таблица 4). При этом более высокой апоптогенной активностью обладает Т-2 токсин.

Таблица 4 - Уровень апоптоза в иммунокомпетентных клетках животных и человека при воздействии токсинов природного происхождения

Экспериментальная группа	Количество апоптотически измененных лимфоцитов, %	
	крысы нелинейные	человек
Контроль	6,0±1,4	7,3±0,5
Т-2 токсин	51,0±6,1	38,6±1,4
Афлатоксин В ₁	18,7±3,1	33,1±2,9

В литературе рассматривается несколько механизмов развития апоптотической гибели клеток. Считается, что одним из важных этапов формирования данного процесса является нарушение процессов обмена кальция в клетке [9, 11]. Это подтверждают проведенные нами исследования по влиянию кальциевого ионофора А23187 и блокатора кальциевых каналов верапамила на интенсивность апоптоза лимфоцитов нелинейных крыс и человека, вызванных воздействием Т-2 токсина и афлатоксина В₁ (рисунок 2). Из представленных на рисунке данных видно, что совместное внесение в культуру лимфоцитов микотоксинов и соединения А23187 приводит к увеличению апоптотической гибели клеток, а внесение в культуру блокатора кальциевых каналов верапамила существенно уменьшает этот процесс.



T-2 токсин

Афлатоксин B₁

Рисунок 2 - Уровень апоптоза в иммунокомпетентных клетках животных и человека при воздействии токсинов природного происхождения и веществ, регулирующих обмен кальция в клетках

Установлено также, что интенсивность апоптоза в присутствии кальциевого ионофора A23187 и блокатора кальциевых каналов верапамила хорошо коррелирует с выраженностью изменения количества жизнеспособных клеток в культурах лимфоцитов, определяемого по интенсивности оптической плотности в реакции с МТТ (таблица 5).

Таблица 5 - Взаимосвязь уровня апоптоза в лимфоцитах нелинейных крыс и количества жизнеспособных клеток в стимулированных митогенами Т- и В-лимфоцитах

Комбинация веществ	Количество апоптотически измененных лимфоцитов, %	Количество жизнеспособных клеток	
		вид клеток	оптическая плотность, % от контроля
Т-2 токсин + A23187	67,1	нестимулированные	3,2
		стимулированные ФГА	16,2
		стимулированные ЛПС	5,2
Т-2 токсин + верапамил	18,4	нестимулированные	47,4
		стимулированные ФГА	73,0
		стимулированные ЛПС	26,3

Из представленных в таблице 5 следует, что в процесс апоптоза под действием Т-2 токсина в большей степени вовлекается популяция В-лимфоцитов, которые стимулируются липополисахаридом кишечной палочки. Об этом свидетельствуют более низкие уровни оптической плотности в данной популяции лимфоцитов, что является следствием снижения количества жизнеспособных клеток в культуре.

Заключение. Показано, что культуры иммунокомпетентных клеток млекопитающих, в частности, лимфоцитов, могут применяться в токсикологических исследованиях при получении исходных данных, необходимых для прогнозирования токсикометрических показателей химических веществ для человека. Предлагаемые методы могут быть использованы также при оценке фармакологической активности новых лекарственных средств в рамках проведения их доклинических и клинических исследований. Установлено, что в механизме действия микотоксинов на клетки иммунной системы человека и животных существенную роль играет апоптоз. Регуляторы обмена кальция могут модулировать уровень апоптотической гибели клеток, вызванных воздействием микотоксинов.

Литература.

1. Болтіна І.В. Использование культуры лимфоцитов периферической крови человека в токсикологических исследованиях // Актуальные проблемы транспортной медицины. 2010. № 4. С. 111-119.
2. Тыньо Я.Я., Ярыгина Е.И., Прохорова Л.Г и др. Культуры клеток как модельные тест-системы для оценки цитотоксического действия веществ различной природы // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. 2015. № 5. С. 43-47.
3. Алпеева Е.В., Сидоренкова А.Ф., Воротеляк Е.А. Экспериментальные клеточные системы: от органов в чашке Петри до «органов-на-чипах» // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. 2017. Т. 72. № 4. С. 187-198.
4. Тутельян В.А., Кравченко Л.В. Микотоксины (медицинские и биологические аспекты). М.: Медицина, 1985. 319 с.
5. Борутова Р., Айдинян Г. Микотоксины: безопасность недопустима // Животноводство России. 2021. № 4. С. 54-59.
6. Самсонов А.И., Шлямина О.В., Насыбуллина Ж.Р. Изучение цитотоксического эффекта афлатоксина В₁ на перевиваемые культуры клеток // Ветеринарный врач. 2021. № 3. С. 52-57. DOI: [10.33632/1998-698X.2021-3-52-57](https://doi.org/10.33632/1998-698X.2021-3-52-57)
7. Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. / Перевод с английского. – National Academy Press, Washington, D.C., 1996. – 138 с.
8. Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow // Scandinave Journal of clinical and laboratory investigations. 1968. Vol. 21 [suppl.№ 97]. P.77-89.
9. Варга О.Ю., Рябков В.А. Апоптоз: понятие, механизмы реализации, значение // Экология человека. 2006. №7. С. 28-32.

10. Савицкая М.А., Онищенко Г.Е. Механизмы апоптоза // Биохимия. 2015. Т. 80, № 11. С. 1613-1627.
11. Бабаев М.Ш., Гусейнова Н.Т., Мамедова Р.Ф. Значение апоптоза и механизмы гибели клеток // Евразийский союз ученых. 2019. № 2-3 (59). С. 25-28. DOI: [10.31618/ESU.2413-9335.2019.3.59.25-28](https://doi.org/10.31618/ESU.2413-9335.2019.3.59.25-28).

References.

1. Boltina I.V. The use of human peripheral blood lymphocyte culture in toxicological studies // Actual problems of transport medicine. 2010. № 4. P. 111-119 [In Russian].
2. Tyño Ya.Ya., Yarygina E.I Prokhorova., L.G. et al. Cell cultures as model test systems to assess the cytotoxic effects of substances of different nature // Veterinary, Zootechnics and Biotechnology. 2015. № 5. P. 43-47 [In Russian].
3. Alpeeva E.V., Sidorenkova A.F., Vorotelak E.A. Experimental cell systems: from organs in a petri dish to "organs-on-chips" // Vestnik Moskovskogo universiteta. Series 16: Biology. 2017. T. 72. № 4. P. 187-198 [In Russian].
4. Tuteljan VA, Kravchenko LV. Mycotoxins (medical and biological aspects). Moscow: Medicina, 1985. 319 p. [In Russian].
5. Borutova R., Aydinyan G. Mycotoxins: carelessness is unacceptable // Zhivotnovodstvo Rossii. 2021. № 4. P. 54-59 [In Russian].
6. Samsonov A.I, Shlyamina O.V, Nasybullina J.R Study of cytotoxic effect of aflatoxin B1 on transplanted cell cultures // Veterinarnyj vrach. 2021. № 3. P. 52-57 [In Russian]. DOI: [10.33632/1998-698X.2021-3-52-57](https://doi.org/10.33632/1998-698X.2021-3-52-57)
7. Guideline for the maintenance and use of laboratory animals. / Translation from English. - National Academy Press, Washington, D.C., 1996. - 138 p. [In Russian].
8. Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow // Scandinave Journal of clinical and laboratory investigations. 1968. Vol. 21 [suppl.№ 97]. P.77-82.
9. Varga O.Yu., Ryabkov V.A. Apoptosis: concept, realization mechanisms, significance. // Ekologiya cheloveka (Human Ecology). 2006. №7. P. 28-32 [In Russian].
10. Savitskaya M.A., Onischenko G.E. Mechanisms of apoptosis // Biochimiya. 2015. V. 80, № 11. P. 1613-1627 [In Russian].
11. Babayev M.Sh., Huseynova N.T., Mamedova R.F. Significance of apoptosis and mechanisms of cell death // Eurasian union of scientists. 2019. № 2-3 (59). P. 25-28 [In Russian]. DOI: [10.31618/ESU.2413-9335.2019.3.59.25-28](https://doi.org/10.31618/ESU.2413-9335.2019.3.59.25-28).