

На правах рукописи

**ТЕРТИЧНАЯ МАРИЯ ВАДИМОВНА**

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР ПРИ ИЗУЧЕНИИ  
ДЕЙСТВИЯ T-2 ТОКСИНА**

**16.00.04 — ветеринарная фармакология с токсикологией**  
**16.00.03 - ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,  
микология с микотоксикологией и иммунология**

**АВТОРЕФЕРАТ**  
**диссертации на соискание ученой степени**  
**кандидата биологических наук**



**Казань - 2005**

Работа выполнена в Федеральном государственном научном учреждении «Всероссийский научно — исследовательский ветеринарный институт (г. Казань)».

- Научный руководитель: Кандидат ветеринарных наук  
**Сергейчев Александр Иванович**
- Научный консультант: Доктор биологических наук  
**Гильмутдинов Рустам Якубович**
- Официальные оппоненты: Доктор биологических наук  
**Хисматуллина Наиля Анваровна**  
Доктор ветеринарных наук, профессор  
**Софронов Владимир Георгиевич**
- Ведущее учреждение: **Чувашская государственная  
сельскохозяйственная академия**

Защита состоится «*17*» *мар* 2005 г. в *10<sup>00</sup>* часов на заседании диссертационного совета Д - 220.012.01 при ФГНУ «Всероссийский научно - исследовательский ветеринарный институт» (420075, г.Казань, Научный городок-2).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке института

Автореферат разослан «*12*» *апрель* 2005 г.

Учёный секретарь диссертационного  
совета, кандидат ветеринарных наук  
ст. науч. сотрудник

 И . Степанов

## 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**1.1 Актуальность темы.** Вопросы этического, разумного и экономного использования животных в современных биологических исследованиях привлекают все большее внимание специалистов и общественности. На сегодня они вполне решаемы, поскольку существуют достаточные возможности не только для сведения количества подопытных животных к минимуму, но и к полной или частичной их замене (Червонская Г.П. и др., 1998; Дядишев Н.Р. и др., 1998; Еропкин М.Ю., 1999; Botham P., Lewis R., 1996; Hurna E., 1997; Combes R., Balls M., 2001 и др.).

На практике подобное можно осуществить благодаря широкому внедрению в эксперимент альтернативных биологических моделей, в том числе культуральных. Последние высокочувствительны к воздействию малых количеств испытуемых веществ, эффект которых на организменном уровне может проявиться лишь при больших дозировках и спустя значительное время (Червонская Г.П. и др., 1998; Афиногенова А.Г. и др., 1999; Еськов А.П. и др., 2003; Flint O., 1996; Louekari K., 1996 и др.).

Культуры клеток занимают все более заметное и важное место в токсикологических, фармакологических и других исследованиях. При этом сфера применения расширяется, а техника культивирования *in vitro* совершенствуется и автоматизируется. Использование культуральных тестов является свидетельством высокого уровня эксперимента в любой сфере как фундаментальных, так и прикладных народно-хозяйственных отраслях (Червонская Г.П. и др., 1998).

Между тем, дороговизна общепринятых химических методов анализа микотоксинов и изучения их токсических свойств на животных вынуждает к поиску и разработке новых более чувствительных и быстрых тестов. Биологические методы в этом плане перспективны и, несмотря на неспецифичность при идентификации микотоксинов, позволяют выявлять их присутствие в исследуемом субстрате (Watson D., Lindsay D., 1982; Buckle A., Sanders M., 1990; Babich H., Borenfreund E., 1991 и др.). Однако, применительно к Т-2 токсину таких исследований не проводилось.

**1.2 Цель и задачи исследования.** Целью работы явилось изучение возможности использования клеточных культур (КК) как альтернативы традиционной методике кожной пробы при экспериментальном Т-2 токсикозе и для предварительного скрининга антидотов. В соответствии с целью исследования поставлены следующие задачи:

1. Сравнить различные методы оценки цитотоксичности *in vitro*;
2. Определить токсические дозы Т-2 и НТ-2 токсинов на перевиваемых культурах клеток почек различных видов животных: крупного рогатого скота (МДВК), свиньи (СПЭВ), овцы (ППЭО) и собаки (МДСК);
3. Изучить коррелятивные отношения токсических доз исследуемых микотоксинов *in vivo* и *in vitro*;
4. Провести сравнительную оценку определения токсического действия Т-2 токсина биологической пробой на кроликах и культуральным методом;

5. Охарактеризовать *in vivo* и *in vitro* эффективность препаратов с потенциально антидотными свойствами при Т-2 токсикозе.

**13 Научная новизна работы.** Впервые проведено сравнительное исследование цитотоксичности Т-2 токсина и его метаболита - НТ-2 токсина *in vitro* на перевиваемых культурах клеток различных видов животных. Определены цитотоксические дозы Т-2 и НТ-2 токсинов для клеточных линий MDBK, СПЭВ, ГОТЭО и МДСК. Показана дозозависимость цитотоксического эффекта данных микотоксинов, выражаемого изменением ростовых и пролиферативных характеристик клеточных культур, снижением жизнеспособности клеток *in vitro*. Изучены коррелятивные отношения между тестами *in vivo* и *in vitro*. Оценена возможность применения клеточных линий в качестве биологической пробы, а также для скрининга потенциальных антидотов при экспериментальном Т-2 токсикозе. Установлено значительное увеличение Т-2 токсином в дозе IC<sub>50</sub> содержания малонового диальдегида (МДА) в культуре клеток MDBK, свидетельствующее о роли перекисного окисления липидов (ПОЛ) в механизме гибели клеток *in vitro* при данном воздействии.

**1.4 Практическая ценность работы.** Результаты проведенных экспериментов расширяют сферу использования культур клеток в токсикологии. Полученные данные свидетельствуют о возможности применения их в качестве биологического теста при выявлении микотоксинов. Клеточная модель - линия MDBK - проявила высокую чувствительность к исследованным лекарственным средствам (натрия селениту и ксимедону) при одновременном внесении с Т-2 токсином и может быть использована в дальнейшем поиске потенциальных антидотов.

Результаты исследования использованы при разработке «Методики по определению цитотоксичности медицинских металлических изделий», утвержденную директором ФГНУ ВНИВИ и генеральным директором ГУЛ ВНИПИМИ, 21.03.2002; «Методических указаний по санитарно-микологической оценке и улучшению качества кормов», утвержденных директором ФГНУ ВНИВИ, 19.11.2003; «Методических рекомендаций по диагностике отравлений животных микотоксинами», утвержденных директором ФГНУ ВНИВИ, 20.12.2004.

**1.5 Апробация работы.** Материалы, представленные в диссертации, доложены и обсуждены на научно-практической конференции, посвященной 70-летию Казанского медико-инструментального завода (Казань, 2001); Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины», посвященной 60-летию факультета ветеринарной медицины Ульяновской ГСХА (Ульяновск, 2003), Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы агропромышленного комплекса» (Казань, 2004), Международной научно-практической конференции, посвященной 80-летию ФГУП «Щелковский биокOMBинат» «Ветеринарная биотехнология: настоящее и будущее» (Щелково, 2004),

**1.6 Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 5 научных работ.

## 1.7 Основные научные положения диссертации, выносимые на защиту:

- метод расчета цитотоксичности *in vitro*;
- использование клеточных культур для оценки токсического действия Т-2 и НТ-2 токсинов;
- возможность использования КК для предварительного скрининга препаратов с потенциально антидотными свойствами при Т-2 токсикозе.

**1.8 Объем и структура работы.** Диссертация изложена на ПО стр., содержит 23 таблицы, проиллюстрирована 5 рисунками, состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты собственных исследований, обсуждение результатов, выводы, практические предложения, список литературы, приложения. Список литературы включает 180 библиографических источников, в т.ч. 119 на иностранном языке.

## 2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Материалы и методы исследований

Работа выполнена в секторе питательных сред, культур клеток и гибридной техники совместно с лабораторией контроля и индикации природных экотоксикантов растительного и животного происхождения ФГНУ Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт (г. Казань) в 2001–2004 г.г.

В опытах *in vitro* использовали почечные линии перевиваемых КК из коллекции ФГНУ ВНИВИ (г. Казань): MDBK (бычка) и MDCK (собаки) полученные Madin S., Darby N. (1958); СПЭВ (эмбриона свиньи), полученная Куликовой К.С. (1959); ППЭО (эмбриона овцы), полученная Хаертыновым С.Х. и др. (1988).

Перевиваемые клетки хранили в жидком азоте при  $-196^{\circ}\text{C}$ , перед использованием размораживали и культивировали при  $+37^{\circ}\text{C}$  до нормализации ростовых свойств.

Культивирование проводили в стандартных условиях монослойно при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  в среде выращивания на основе сред Игла-МЕМ и 199, 0,5%-ого раствора гидролизата лактоальбумина (ГЛА), сывороток крови бычьей (для линий MDBK и СПЭВ) и плодов коров (для линий ППЭО и MDCK).

Антибиотики стрептомицин, пенициллин и канамицин вносили в дозе 100 ЕД/мл, 3%-ый раствор глутамина - по 2,5 мл на 1,5 л готовой среды. Клеточные линии поддерживали путем периодического пассирования в стеклянных матрасах объемом 250 мл. Пересев проводили по мере формирования монослоя, как правило, через 4 - 5 суток культивирования. Клетки диспергировали смесью растворов версена и трипсина в соотношении 1:3.

Опыты *in vivo* проведены на лабораторных крысах и кроликах обоего пола. В экспериментах использовались беспородные белые крысы в возрасте 4 - 6 месяцев, массой 180 — 250 г. Дерматотоксичность Т-2 токсина изучали на белых, непигментированных кроликах массой 2 - 3 кг.

Экспериментальные животные проходили 15-дневную обсервацию в условиях вивария, кормление осуществляли согласно общепринятым зоотехническим нормам. В течение всего опыта животные находились в одинаковых условиях содержания и кормления. При моделировании различных

форм микотоксикоза опытные и контрольные группы животных формировались по принципу аналогов.

Для экспериментальной контаминации КК и животных использовали кристаллические Т-2 и НТ-2 токсины, синтезированные в лаборатории природных экотоксикантов ФГНУ ВНИВИ (г. Казань) с.нх. Сергейчевым А.И., не отличающиеся по физико-химическим и токсическим свойствам от существующих стандартов. В качестве продуцента использовали штамм 2т-15 гриба *Fusarium sporotrichiella*, предоставленный Котиком А.Н.

Токсический эффект исследуемых микотоксинов на перевиваемые КК определяли по пролиферативной активности последних. Для этого клеточную суспензию разливали в «пенициллиновые» флаконы по 2 мл в каждый. Т-2 и НТ-2 токсины в виде спиртового раствора вносили в количестве 10 мкл. В качестве контроля использовали такое же количество 96%-ого этилового спирта. Затем флаконы с культурой выдерживали в термостате при температуре 37°C в течение 96 ч, после чего клетки диспергировали смесью растворов версена и трипсина в количестве 0,2 мл на флакон и выдерживали в термостате 15-20 мин при 37°C. Для прекращения действия трипсина и версена дополнительно вносили готовую питательную среду с сывороткой бычьей крови в количестве 1 мл на «пенициллиновый» флакон.

Подсчет посеянных и выросших клеток осуществляли в камере Горяева, учитывая только те, что расположены в границах камеры, очерченных сеткой (225 больших квадратов). Для определения жизнеспособности клеток к 1 мл пробы суспензии добавляли 1 мл 0,5%-ого водного раствора трипанового синего. При этом живые клетки оставались бесцветными, а мертвые окрашивались в синий цвет.

Влияние токсинов на культурально-морфологические свойства клеток определяли с учетом: коэффициента жизнеспособности (КЖ) — отношение живых клеток к общему их количеству, выраженное в %; индекса пролиферации (ИП) - отношение числа выросших клеток к числу засеянных; индекса цитотоксичности (ИЦ) (Дьяконов Л.П. и др., 2000) - отношение числа изначально засеянных к числу живых, оставшихся после экспозиции с токсином; плотности клеточной популяции (П111) — количество клеток в 1 мл; цитотоксического индекса ШТИ) (Червонская Г.П. и др., 1988) определяемого по формуле:

$$\text{ШТИ} = \frac{a - b}{a}$$

где: а - % естественной гибели клеток в контроле; b - % поврежденных клеток в опыте.

Уровень ПОЛ определялся в клеточной суспензии спектрофотометрически при длине волны 532 нм после предварительного подсчета клеток по содержанию МДА по Гончаренко М.С. и Латиновой А.М. (1985). Результат выражали в нмолях МДА на 10<sup>6</sup> клеток.

Кожную пробу ставили на кроликах согласно ГОСТ 13496.7 - 97 на 6 группах по 4 животных в каждой. При этом в области бедра животного выстригали участок кожи размером 6х6 см на который наносили 5%-ый водно-спиртовой раствор Т-2 токсина в исследуемой дозе. Контрольной группе наносили водно-спиртовой раствор без токсина в том же количестве. Учет реакции вели на следующий день после нанесения токсина и продолжали в течение 3 - 5 дней в зависимости от развития реакции.

Интоксикацию подопытных животных Т-2 токсином производили 5%-ым водно-спиртовым раствором путем орального введения с использованием шприца и иглы с оливой.

При изучении эффективности потенциальных антидотов (ншрия селенита и ксимедона) Т-2 токсин применяли в дозе LD<sub>50</sub>. Натрия селенит в дозах 0,1-0,15 мг/кг вводили внутривентрикулярно за 3-е суток до затравки. Ксимедон вводили в дозах 50, 100 и 200 мг/кг также внутривентрикулярно 3-хкратно (с интервалом 24 часа) перед воздействием Т-2 токсина.

Цифровой материал подвергался статистической обработке на персональном компьютере общепринятыми методами вариационной статистики с вычислением средней арифметической (М), ошибки средней арифметической ( $\pm t$ ), критерия достоверности Стьюдента (t) и коэффициента корреляции (r) с использованием программы Microsoft Excel.

## 2.2 Результаты собственных исследований

### 2.2.1 Характеристика различных методов оценки цитотоксичности

При изучении токсичности Т-2 токсина для перевиваемых культур животных клеток с помощью предлагаемых различными авторами индекса цитотоксичности (по Дьяконову Л.П., 2000) и цитотоксического индекса (по Червонской Г.П., 1988) получены противоречивые и трудно сопоставимые результаты (табл.1). Кроме того, у обоих этих методов расчета выявлены определенные недостатки. ИЦ (по Дьяконову Л.П., 2000), например, необходимо рассчитывать также для контроля, и лишь затем сравнивать полученные результаты. Данный индекс не определяется при 100%-ой гибели клеток в культуре. При расчете ЦТИ (по Червонской Г.П., 1988) невозможно точно определить процент погибших клеток, вследствие открепления их от монослоя и попадания в среду инкубации, которая сливается из флаконов перед обработкой клеток смесью растворов трипсина и версена. Другой, используемый при изучении цитотоксичности, индекс, а именно коэффициент жизнеспособности клеток в культуре (КЖ), нельзя рассматривать самостоятельно, без учета индекса пролиферации (ИП).

В связи с изложенным мы провели поиск нового показателя, оптимально отражающего токсические эффекты на клетки *in vitro*, и, на основании полученных результатов, предлагаем цитотоксичность рассчитывать через отношение живых клеток, оставшихся после экспозиции с препаратом к числу живых клеток в контроле.

Исходя из результатов экспериментов, определяли максимально переносимую дозу (МПД), IC<sub>50</sub> ДС<sub>100</sub> исследуемых микотоксинов для культур клеток.

МПД - доза вещества, не оказывающая видимого цитотоксического действия на клетки в культуре. При этом используемые показатели максимально приближены к контрольным. Значение предлагаемого нами цитотоксического индекса (ЦИ) должно приближаться к 1, а ЦТИ должен быть < 0,15 (Червонская Г.П. и др., 1988).

IC<sub>50</sub> - доза вещества, при которой гибнет 50% клеток по сравнению с контролем. ЦИ при этом должен быть равен около 0,5.

IC<sub>100</sub> - доза вещества, при которой происходит гибель 100% клеток.

Таблица 1 - Характеристика токсичности Т-2 токсина для культур клеток

Клеточная линия	Доза токсина, М	Коэффициент жизнеспособности	Индекс пролиферации	Индекс цитотоксичности (по Дьяконову)	Цитотоксический индекс (по Червонской)	Предлагаемый цитотоксический индекс
МДБК	1,07×10 <sup>-6</sup>	0	0,4±0,1***		-134,9±70,9	0
	2,08×10 <sup>-9</sup>	96,3±1,2**	2,1±0,1***	0,50±0,03***	-3,6±1,9	0,50±0,03
	0,26×10 <sup>-9</sup>	99,0±0,4	4,0±0,1	0,25±0,01	-0,08±0,03	0,99±0,02
	Контроль	98,1±0,4	4,0±0,1	0,25±0,01		
МДСК	0,54×10 <sup>-6</sup>	0	0,6±0,1***		-124,9±51,3	0
	2,08×10 <sup>-9</sup>	97,1±0,6*	2,2±0,1***	0,47±0,02***	-2,5±1,1	0,50±0,02
	0,26×10 <sup>-9</sup>	99,1±0,3	4,2±0,1	0,24±0,01	-0,03±0,01	1,00±0,01
	Контроль	99,1±0,4	4,2±0,1	0,24±0,02		
СПЭВ	26,82×10 <sup>-6</sup>	0	0,2±0,1***		-113,9±22,8	0
	1,03×10 <sup>-9</sup>	96,2±0,4***	2,1±0,1***	0,49±0,01***	-2,6±0,7	0,50±0,01
	0,13×10 <sup>-9</sup>	99,0±0,2	4,1±0,1	0,25±0,01	-0,10±0,04	0,99±0,02
	Контроль	99,1±0,2	4,1±0,1	0,25±0,01		
ПЦЭО	0,54×10 <sup>-6</sup>	0	0,9±0,1***		-93,6±26,4	0
	4,18×10 <sup>-9</sup>	97,7±0,3**	1,8±0,1***	0,55±0,01***	-1,2±0,6	0,50±0,01
	0,51×10 <sup>-9</sup>	98,8±0,3	3,7±0,1	0,27±0,01	-0,04±0,02	0,99±0,03
	Контроль	98,9±0,3	3,7±0,1	0,27±0,01		

Примечание: \*, \*\*, \*\*\* - уровни достоверности различия с контролем, соответственно p≤0,05, p≤0,01 и p≤0,001.

### 2.2.2 Цитотоксичность Т-2 токсина *in vitro*

Результаты сравнительных опытов по определению токсичности Т-2 токсина для перевиваемых культур клеток различных видов животных представлены в табл. 1.

Анализируя данные таблицы можно сделать вывод, что КЖ, ИП, ИЦ для различных клеточных линий при внесении токсина в МПД не имели значительных различий от контроля, ЦГИ был меньше 0,15, а предлагаемый ЦИ был практически равен 1. При внесении токсина в дозе  $IC_{50}$  происходило снижение КЖ на 3-4%, а ИП и ЦИ в 2 раза, тогда как ИЦ увеличивался в 2 раза. При дозе токсина  $IC_{100}$  жизнеспособные клетки в суспензии отсутствовали.

В сжатой форме цитотоксические дозы Т-2 токсина для клеточных линий различных видов животных выглядят следующим образом (табл. 2):

Таблица 2 - Токсичность Т-2 токсина для перевиваемых культур клеток почек разных видов животных

Культура клеток	Дозы микотоксина, М		
	$IC_{100}, \times 10^{-6}$	$IC_{50}, \times 10^{-9}$	МПД, $\times 10^{-9}$
МДВК	1,07	2,08	0,26
МДСК	0,54	2,08	0,26
СПЭВ	2,15	1,03	0,13
ППЭО	0,54	4,18	0,51

Из результатов табл. 2 видно, что значительной разницы в величинах токсических доз Т-2 токсина для клеточных линий различных видов животных нет. Так, к примеру, при определении  $IC_{50}$  и МПД для клеточных линий МДВК и МДСК результаты были аналогичными, а колебания доз для СПЭВ и ППЭО относительно двух вышеуказанных линий клеток несущественными, с учетом степени разведения токсина.

Полученные нами данные согласуются с результатами исследований Laufrate S. et al. (1995) по  $IC_{50}$ , но не соответствуют по  $IC_{100}$  для грануломоноцитарных колониеобразующих клеток человека и культуры клеток крыс при 7-, 10- и 14-дневных экспозициях.  $IC_{50}$  для указанных клеток составила, соответственно,  $1,6 \times 10^{-9}$ ;  $3,6 \times 10^{-9}$ ;  $1,4 \times 10^{-9}$  и  $2,2 \times 10^{-9}$ ;  $3,3 \times 10^{-9}$ ;  $2,6 \times 10^{-9}$  М. Полная же их гибель происходила при увеличении концентрации токсина до  $10^{-7}$  М, тогда как в наших экспериментах она отмечалась при концентрации Т-2 токсина  $10^{-6}$  М, что мы связываем с меньшим сроком экспозиции.

Несмотря на отсутствие значительных различий для  $IC_{50}$ ,  $IC_{100}$  и МПД в проведенных нами опытах, некоторые исследователи отмечают существенную разницу этих доз для культур клеток отдельных видов животных. Например,  $IC_{50}$

для культуры клеток бычьей почки в исследованиях Holt P. et al. (1988) была равна  $4,72 \times 10^9$  М, для соединительнотканых клеток мыши -  $23,4 \times 10^9$  М. При 27 часовой экспозиции клеток костного мозга мыши  $IC_{50}$  составила  $0,86 \times 10^{13}$  М, тогда как тимоциты мыши при этой дозе погибали уже через 5-6 ч (Dininno V. et al., 1988). Эти факты объяснимы, вероятно, методическими особенностями экспериментов, определяемыми задачами указанных исследователей.

### 2.2.3 Видовые особенности токсичности Т-2 токсина *in vivo* и *in vitro*

Существенного различия коэффициента корреляции токсических доз Т-2 токсина между различными видами животных не отмечалось. При этом он при сравнении  $LD_{100}$ ,  $LD_{50}$ , ПДК в кормах для животных с одной стороны, и  $IC_{100}$ ,  $IC_{50}$ , МПД для культур клеток с другой для крупного рогатого скота, свиней, собак был равен в наших опытах 0,63 ( $p < 0,01$ ), а для овец - 0,59 ( $p < 0,01$ ). Это связано, очевидно, с тем, что в опытах *in vivo* разница между  $LD_{50}$  и  $LD_{100}$  составляла в среднем около 20%, тогда как в опытах *in vitro* значения  $IC_{50}$  и  $IC_{100}$  различались на два порядка.

При сравнении  $LD_{100}$  для различных видов животных и  $IC_{50}$  для культур клеток этих же видов коэффициент корреляции составил всего 0,38 ( $p < 0,05$ ), что свидетельствует о незначительной степени взаимосвязи между данными показателями токсичности Т-2 токсина. Взаимосвязь ПДК и МПД практически отсутствовала (коэффициент корреляции составил 0,02,  $p > 0,05$ ).

В отношении же  $LD_{50}$  и  $IC_{50}$ , напротив, наблюдалась значительная обратная корреляция (**-0,75,  $p \leq 0,01$** ), особенно выраженная у трех из исследованных (свиней, овец и собак) видов животных.

### 2.2.4 Цитотоксичность НТ-2 токсина *in vitro*

Известно, что основным метаболитом при взаимодействии Т-2 токсина с организмом животных является НТ-2 токсин. Аналогичная ситуация имеет место, очевидно, и в КК. Так, в исследованиях Trusal L. (1986) и Yagen B. et al. (1991) было установлено, что в течение 1,5 часов до 30% Т-2 токсина метаболизировалось в КК в НТ-2 токсин, в меньшем количестве обнаруживались Т-2 триол и Т-2 тетраол, причем количество метаболитов в процессе инкубации нарастало.

Результаты проведенных нами исследований по определению токсичности НТ-2 токсина для перевиваемых культур клеток почек различных видов животных представлены в табл. 3 и 4.

Таблица 3 - Характеристика токсичности НТ-2 токсина для культур клеток

Клеточная линия	Доза токсина, М	Коэффициент жизнеспособности	Индекс пролиферации	Индекс цитотоксичности (по Дьяконову)	Цитотоксический индекс (по Червонской)	Предлагаемый цитотоксический индекс
МДВК	$4,72 \times 10^{-5}$	0	$0,4 \pm 0,1^{***}$		$-105,4 \pm 34,5$	0
	$0,88 \times 10^{-6}$	$97,2 \pm 0,3^{**}$	$2,0 \pm 0,1^{***}$	$0,50 \pm 0,01^{***}$	$-1,8 \pm 0,8$	$0,50 \pm 0,01$
	$1,47 \times 10^{-7}$	$98,9 \pm 0,4$	$4,0 \pm 0,1$	$0,25 \pm 0,01$	$-0,04 \pm 0,02$	$1,00 \pm 0,02$
	Контроль	$98,9 \pm 0,4$	$4,0 \pm 0,1$	$0,25 \pm 0,01$	$98,9 \pm 0,4$	
МДСК	$3,54 \times 10^{-5}$	0	$0,6 \pm 0,1^{***}$		$-110,5 \pm 32,9$	0
	$0,59 \times 10^{-6}$	$97,5 \pm 0,5^{**}$	$2,2 \pm 0,1^{***}$	$0,48 \pm 0,01^{***}$	$-1,7 \pm 0,3$	$0,50 \pm 0,01$
	$1,47 \times 10^{-7}$	$98,9 \pm 0,3$	$4,2 \pm 0,1$	$0,24 \pm 0,01$	$-0,08 \pm 0,03$	$0,99 \pm 0,03$
	Контроль	$99,0 \pm 0,3$	$4,2 \pm 0,1$	$0,24 \pm 0,01$		
СПЭВ	$4,72 \times 10^{-5}$	0	$0,2 \pm 0,1^{***}$		$-106,8 \pm 21,6$	0
	$0,59 \times 10^{-6}$	$96,8 \pm 0,5^{***}$	$2,1 \pm 0,1^{***}$	$0,50 \pm 0,01^{***}$	$-2,4 \pm 0,7$	$0,50 \pm 0,01$
	$0,75 \times 10^{-7}$	$98,9 \pm 0,2$	$4,1 \pm 0,1$	$0,25 \pm 0,01$	$-0,05 \pm 0,02$	$1,00 \pm 0,01$
	Контроль	$99,0 \pm 0,2$	$4,1 \pm 0,1$	$0,25 \pm 0,01$		
ППЭШ	$2,36 \times 10^{-5}$	0	$0,9 \pm 0,1^{***}$		$-93,8 \pm 31,9$	0
	$1,18 \times 10^{-6}$	$97,4 \pm 0,8^*$	$1,9 \pm 0,1^{***}$	$0,54 \pm 0,01^{***}$	$-1,4 \pm 0,9$	$0,50 \pm 0,02$
	$0,75 \times 10^{-7}$	$98,8 \pm 0,4$	$3,7 \pm 0,1$	$0,27 \pm 0,01$	$-0,05 \pm 0,02$	$1,00 \pm 0,03$
	Контроль	$98,8 \pm 0,4$	$3,7 \pm 0,1$	$0,27 \pm 0,01$		

Примечание: \*, \*\*, \*\*\* - уровни достоверности различия с контролем, соответственно  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$  и  $p \leq 0,001$ .

При сравнении данных таблиц 1 и 3, значения различных коэффициентов были аналогичны у всех клеточных линий, при внесении токсинов в сопоставимых дозах. При дозах НТ-2 токсина  $IC_{50}$  и  $IC_{100}$  по сравнению с контрольными показателями происходила гибель 50 и 100% клеток, соответственно, тогда как в МПД он не вызывал существенных изменений.

Таблица 4 - Токсичность НТ-2 токсина для перевиваемых культур клеток различных видов животных

Культура клеток	Дозы микотоксина, М		
	IC <sub>100</sub> , ×10 <sup>-5</sup>	IC <sub>50</sub> , ×10 <sup>-6</sup>	МПД, ×10 <sup>-7</sup>
МДВК	4,72	0,88	1,47
МДСК	3,54	0,59	1,47
СПЭВ	4,72	0,59	0,75
ППЭО	2,36	1,18	0,75

Из анализа таблицы 4 можно сделать вывод, что токсичность НТ-2 токсина, как и в случае с Т-2 токсином, для культур клеток разных видов животных, не имела значительных колебаний, а для некоторых линий дозы были равными: IC<sub>100</sub> - для линий МДВК и СПЭВ, IC<sub>50</sub> - для МДСК и СПЭВ, МПД - для МДВК и МДСК. Различие же в величинах токсичности у исследованных КК можно считать несущественным вследствие низкой дозировки токсина.

По нашим данным токсичность для перевиваемых клеточных линий НТ-2 токсина значительно ниже, чем Т-2 токсина. Так, если IC<sub>50</sub> для последнего составляла 10<sup>09</sup> М, то для НТ-2 токсина эта же доза равнялась 10<sup>06</sup> М. Данная тенденция прослеживается и в опытах *in vivo*, хотя для НТ-2 токсина определена LD<sub>50</sub> лишь у некоторых видов животных. Например, для свиней и крупного рогатого скота она составляет 40 и 32 мг/кг, соответственно, что на порядок больше, чем данная доза Т-2 токсина.

### 2.2.5 Динамика пролиферативной активности в культуре клеток при внесении Т-2 токсина

В опытах на перевиваемых клеточных линиях МДВК, МДСК, СПЭВ и ППЭО максимальной величины пролиферативная активность в контроле (без внесения токсина) достигала через 96 часов инкубации. Через 24 часа количество клеток увеличивалось незначительно, через 48 часов возрастало в 1,7-1,9 раза, через 72 часа - в 2,5-2,8 раза.

При дозе Т-2 токсина IC<sub>100</sub> уже через 24 часа количество живых клеток в линиях МДВК, МДСК и СПЭВ снижалось почти в 2 раза, к 48 часам - в 5 раз, к 72 часам - в 10 раз, а через 96 часов жизнеспособные клетки выявить не удалось. Токсический эффект был более выражен для линии ППЭО. Так, через 24 часа количество живых клеток снизилось в 3 раза, к 48 часам - в 10 раз, к 72 часам в - 20 раз и к 96 часам они отсутствовали.

Таким образом, максимальный токсический эффект для всех использованных клеточных линий при внесении Т-2 токсина отмечался к 96 часам инкубации, а в первые трое суток инкубации наибольший цитотоксический эффект наблюдался у линии ППЭО. Меньшее количество клеток у культуры

ППЭО (по сравнению с остальными клеточными линиями) связано, очевидно, с изначально низким индексом ее пролиферации в контроле.

При дозе Т-2 токсина  $IC_{50}$  отмечалась слабая клеточная пролиферация. Через 24 часа инкубации количество клеток возрастало на 10 - 15%, что сопоставимо с контрольными показателями. Но к 48 часам количество клеток повышалось уже в меньшей, чем в контроле, степени, увеличиваясь лишь на 30-40%, к 72 часам - на 50% у культуры клеток ППЭО и 60-70% - у остальных клеточных линий. Количество клеток в культуре нарастало, достигая максимума, как и в контроле, к 96 часам инкубации, при этом общее количество клеток было практически в 2 раза меньше контрольных показателей.

### 2.2.6 Эффективность натрия селенита в качестве потенциального антидота Т-2 токсина

Общеизвестно выраженное антиоксидантное действие натрия селенита. Имеется единичное сообщение об использовании его в качестве средства, повышающего устойчивость организма к Т-2 токсину (Кравченко Л.В. и др., 1990).

Нами проведена серия опытов на беспородных белых крысах по изучению профилактической эффективности натрия селенита при введении животным Т-2 токсина в дозе  $LD_{50}$ - Результаты исследования представлены в табл. 5.

Таблица 5 - Профилактическая эффективность натрия селенита при отравлении крыс Т-2 токсином

Доза препарата, мг/кг	Эффективность		
	пало	выжило	% ВЫЖИВШИХ
0,1	5	5	50
0,12	3	7	70
0,13	3	7	70
0,15	8	2	20
контроль	5	5	50

Из таблицы видно, что натрия селенит наиболее эффективен для профилактики острого Т-2 токсикоза в дозах 0,12 - 0,13 мг/кг. Выживаемость животных возросла на 20%, по сравнению с контролем. Увеличение смертности животных при внесении натрия селенита в дозе 0,15 мг/кг связано, очевидно, с тем, что величины лечебной и токсической доз данного препарата очень близки. Наблюдается четкая тенденция увеличения продолжительности жизни опытных животных по сравнению с контрольными. Клинические признаки интоксикации также были менее выражены.

### 2.2.7 Профилактическая эффективность ксимедона при экспериментальном Т-2 токсикозе

В опытах на беспородных белых крысах изучена профилактическая эффективность ксимедона при остром отравлении животных Т-2 токсином в дозе LD<sub>50</sub>. Результаты исследования представлены в табл. 6.

Таблица 6 - Профилактическая эффективность ксимедона при отравлении крыс Т-2 токсином

Доза препарата, мг/кг	Эффективность		
	пало	выжило	% ВЫЖИВШИХ
25	5	5	50
50	4	6	60
100	2	8	80
200	3	7	70
контроль	5	5	50

Согласно данным таблицы наибольшую профилактическую эффективность при остром экспериментальном Т-2 токсикозе ксимедон проявлял в дозе 100 мг/кг. Выживаемость животных при этом составляла 80%, что выше контрольных значений на 30%. При дозах препарата 50 и 200 мг/кг выживаемость животных увеличивалась на 10 и 20% по сравнению с контролем, соответственно. Одновременно с меньшей выраженностью клинических признаков микотоксикоза наблюдалась четкая тенденция увеличения продолжительности жизни опытных животных по сравнению с контрольными.

### 2.2.8 Цитотоксичность Т-2 токсина *in vitro* на фоне воздействия фармакологических средств с потенциальными антидотными свойствами

Были проведены исследования сочетанного воздействия Т-2 токсина в дозе IC<sub>50</sub> (2,08x10<sup>-9</sup> М) и фармакологических средств с потенциальными антидотными свойствами (натрия селенита и ксимедона) на клеточную линию MDBK.

Одновременно с внесением токсина вводились спиртовые растворы натрия селенита в дозе 0,2 мкг/мл клеточной суспензии и ксимедона в дозе 0,05 мг/мл. Длительность экспозиции препаратов с токсином равнялась 96 ч, после чего подсчитывалось количество клеток.

Результаты исследований приведены в табл. 7.

Таблица 7 - Влияние натрия селенита и ксимедона на токсичность Т-2 токсина для клеточной линии MDBK

Внесенные вещества	Коэффициент жизнеспособности	Индекс пролиферации	Индекс цитотоксичности	Цитотоксический индекс	Предлагаемый цитотоксический индекс
Контроль (спирт этиловый)	99,1±0,4	4,0±0,1	0,25±0,01		
Т-2 токсин	96,3±1,2**	2,1±0,1***	0,50±0,03***	-3,6±1,9	0,50±0,03
Т-2 токсин + натрия селенит	96,9±0,6**	3,3±0,1***	0,31±0,002***	-2,3±0,9	0,81±0,02
Т-2 токсин + ксимедон	97,1±0,8*	2,7±0,1***	0,38±0,003***	-2,2±1,1	0,65±0,02

Примечание: \*, \*\*, \*\*\* - уровни достоверности различия с контролем, соответственно,  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$  и  $p \leq 0,001$ .

Из таблицы видно, что при совместном внесении в клеточную суспензию Т-2 токсина и ксимедона ИП = 2,7; КЖ = 97,1; предлагаемый нами цитотоксический индекс = 0,65; что составило 128; 101 и 130% от таковых при внесении только токсина, соответственно. ИЦ при этом был равен 0,38; что составляет 76% от данного показателя в случае внесения только токсина и свидетельствует о снижении цитотоксичности. Однако данные показатели все же были существенно ниже таковых в контроле (на 34,5; 17,9 и 35,5%, соответственно).

Таким образом, можно констатировать защитное действие данного препарата на клетки, хотя и недостаточное для полного блокирования цитотоксического действия Т-2 токсина.

При сочетанном внесении Т-2 токсина и натрия селенита в суспензию клеток защитное влияние последнего по сравнению с ксимедоном было более выражено. Индексы ИП, КЖ и предлагаемый нами цитотоксический индекс равнялись 3,3; 97,0 и 0,81, соответственно. Это было больше, чем при внесении только данного микотоксина на 159, 101 и 162%, соответственно. ИЦ при этом был меньше на 38%. Однако, так же как и в предыдущем случае, эти показатели не достигали контрольных значений и были меньше их соответственно на 17, 2 и 19%.

### 2.2.9 Перекисное окисление липидов в клетках MDBK при воздействии Т-2 токсина

В исследованиях на клеточной линии MDBK дозы Т-2 токсина, ксимедона и натрия селенита составили  $2,08 \times 10^{-9}$  М; 0,05 мг/мл и 0,4 мкг/мл, соответственно. Время инкубации равнялось 96 часов. Результаты исследования представлены в табл. 8.

Таблица 8 - Содержание МДА в клетках MDBK при внесении в суспензию Т-2 токсина в дозе  $1C_{50}$  и в сочетании с ксимедоном и натрия селенитом

Внесенные вещества	МДА, $\mu\text{M}/10^6$ клеток
Контроль	0,100±0,006
Т-2 токсин	0,602±0,024*
Т-2 токсин + ксимедон	0,399±0,015*
Т-2 токсин + натрия селенит	0,259±0,009*

Примечание: \* - уровни достоверности различия с контролем  $p \leq 0,001$ .

Т-2 токсин усиливает перекисное окисление липидов в культуре клеток, в сравнении с контролем в 6 раз. ПОЛ, индуцированное Т-2 токсином на фоне введения ксимедона и натрия селенита увеличивается в меньшей степени. Так, при сочетании Т-2 токсина с ксимедоном концентрация МДА возрастает в 4 раза, а при использовании натрия селенита - только в 2,5 раза.

Многочисленными работами показано ингибирование Т-2 токсином биосинтеза белка в культурах клеток на стадии трансляции (Ueno Y. et al., 1973.; Cannon M. et al., 1976; Sorenson W. et al., 1986; Middlebrook J. et al., 1989 б), в результате чего происходит гибель клетки.

Индукция ПОЛ рассматривается многими авторами как важнейший компонент цитотоксического действия (Барабой В.И. и др., 1992; Еропкин М.Ю. и др., 1997; Brogaard B., Clausen J., 1997). МДА является одним из конечных продуктов ПОЛ и оказывает токсическое действие за счет сшивок биополимеров (Козлов А. В., 1985), что ведет к необратимой инактивации ферментов антиоксидантной системы клетки (Каган В.Е. и др., 1974). Это вызывает усиление интенсивности свободнорадикальных процессов, опосредованных активными формами кислорода (Хрипач Л., 2002).

Таким образом, мы считаем, что наряду с ингибированием биосинтеза белка, другим механизмом гибели клеток в культуре при воздействии Т-2 токсина является индукция ПОЛ.

## 2.2.10 Токсичность Т-2 токсина при постановке кожной пробы на кроликах

Результаты исследования дерматотоксичности Т-2 токсина представлены в таблице 9.

Таблица 9 - Дерматотоксические свойства Т-2 токсина в исследованиях на кроликах

№№ группы	Доза токсина, мкг/пробу	Выраженность клинических признаков				
		Сроки наблюдения, ч				
		24	48	72	96	120
1	0,005	-	-	-	-	-
2	0,01	+	+	+	+	-
3	1	+	+	+	+	+
4	500	+	++	++	++	++
5	1000	++	+++	+++	+++	+++
6	контроль	+	-	-	-	-

Примечание: + - гиперемия, заканчивающаяся шелушением кожи; ++ - гиперемия, болезненность и отечность, проявляющаяся незначительным утолщением кожи с последующим образованием отдельных корочек; +++ - резкая гиперемия, болезненность, складчатость, отек, проявляющийся резким утолщением кожи, на всей поверхности участка появляются язвы, затем сплошной струп.

Дерматотоксичность Т-2 токсина носила дозозависимый характер. Так, при дозе 0,01 мкг/пробу на протяжении практически всего времени наблюдения (96 часов) отмечалась гиперемия кожных покровов. Во второй группе животных (1 мкг/пробу) покраснение кожи было более выраженным и сохранялось в течение всего эксперимента. При аппликации Т-2 токсина в дозах 500 и 1000 мкг/пробу наблюдали некротические явления кожных покровов. В то же время, в контрольной группе в первые 24 часа наблюдения также отмечали слабовыраженную гиперемию, не сопровождавшуюся в последующем шелушением кожи. Таким образом, минимальной дозой Т-2 токсина, которую можно определить кожной пробой является 0,01 мкг/пробу.

В исследованиях *in vitro* минимальная доза Т-2 токсина, при превышении которой проявляются первые признаки цитотоксического действия, колебалась от  $0,3 \times 10^9$  М (для линии СПЭВ) до  $0,5 \times 10^9$  М (для линии ППЭО), что на порядок ниже использующихся на сегодня в токсикологических исследованиях биологических проб.

Кроме того, исследование цитотоксичности на перевиваемых культурах клеток позволяет значительно сократить сроки исследования. Так, при наличии микотоксина в дозе близкой к  $1C_{100}$  уже в первые сутки наблюдается резкое (в 2-3 раза) снижение количества жизнеспособных клеток, а при дозе  $1C_{50}$  через 48 часов инкубации количество клеток было меньше на 30 - 40%, по сравнению с контрольными показателями.

## ВЫВОДЫ

1. Предложен метод расчета цитотоксичности через отношение живых клеток, оставшихся после экспозиции с препаратом к числу живых клеток в контроле.
2. Установлена меньшая токсичность НТ-2 токсина по сравнению с Т-2 токсином для перевиваемых культур клеток MDBK, MDCK, СПЭВ и ППЭО, а именно  $IC_{50}$  Для Т-2 токсина составляла в среднем  $10^{10}$  М, тогда как для НТ-2-Ю<sup>М</sup>.
3. Выявлена слабая видовая зависимость токсичности Т-2 и НТ-2 токсинов *in vitro* и *in vivo*. Корреляция показателей  $LD_{100}$ ,  $LD_{50}$ , ПДК в кормах для различных видов животных и  $IC_{100}$ ,  $IC_{50}$ , МПД для культур клеток этих же видов существенно не различалась. Коэффициент корреляции для крупного рогатого скота, свиней и овец составил 0,63 ( $p < 0,01$ ), а для овец - 0,59 ( $p < 0,01$ ).
4. Показано увеличение содержания МДА в культуре клеток MDBK Т-2 токсином, что свидетельствует о значительной роли индукции ПОЛ в механизме гибели клеток *in vitro* при воздействии данного токсина.
5. Биоиндикация Т-2 токсина с использованием клеточных культур обладает рядом преимуществ перед каждой пробой на кроликах: минимальная токсическая концентрация токсина для культуры клеток на порядок ниже; в 2-3 раза сокращаются сроки исследования; перевиваемые культуры клеток относительно дешевы, доступны и т.д.
6. Выявлено снижение ксимедоном и натрия селенитом токсического действия Т-2 токсина на животных (белые крысы) и культурах клеток (MDBK). Данные препараты в дозах эквивалентных терапевтическим, повышали выживаемость клеток *in vitro* при воздействии Т-2 токсина на 15 и 20%, а также снижали содержание МДА на 33 и 57%, соответственно. В экспериментах *in vivo* выживаемость увеличивалась на 30 и 20%, соответственно.
7. Экспериментально показана возможность использования клеточных культур для первичного скрининга препаратов с потенциальным лечебно-профилактическим действием при Т-2 токсикозе.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Выявлена принципиальная возможность скрининга препаратов - потенциальных антидотов Т-2 токсина с помощью клеточных культур, а также использование их для диагностики микотоксикозов.

По результатам исследования разработаны и рекомендованы для внедрения в практику:

1. «Методика» по определению цитотоксичности медицинских металлических изделий, утвержденная директором ФГНУ ВНИВИ и генеральным директором ГУЛ ВНИПИМИ 21.03.2002 г.;

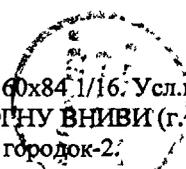
2. «Методические указания по санитарно-микологической оценке и улучшению качества кормов», утвержденные директором ФГНУ ВНИВИ 19.11.2003 г.;

3. «Методические рекомендации по диагностике отравлений животных микотоксинами», утвержденные директором ФГНУ ВНИВИ 20.12.2004 г.

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Студеникина Ф.Г., Гильмутдинов Р.Я., Матвеева Л.И., Гизатуллина А.С., Тертичная М.В. Исследования цитотоксичности медицинских материалов на перевиваемых культурах клеток. // Материалы научно-практической конференции, посвященной 70-летию Казанского медико-инструментального завода 21 сентября 2001 г. - Казань, 2001. - С. 25.
2. Тертичная М.В. К определению цитотоксичности на перевиваемых культурах клеток. // Материалы международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины», посвященной 60-летию факультета ветеринарной медицины Ульяновской государственной с- х. академии 25-26 сентября 2003 г. - Ульяновск, 2003. - Т.2.-С.140-141.
3. Тертичная М.В. Воздействие Т-2 токсина на культуры клеток различных видов животных. // Материалы Всероссийской научно-практической конференции по актуальным проблемам агропромышленного комплекса. - Казань, 2004.-С. 181-182.
4. Тертичная М.В., Гильмутдинов Р.Я. Культура клеток как альтернативная модель при скрининге различных веществ. // Материалы Всероссийской научно-практической конференции по актуальным проблемам агропромышленного комплекса. - Казань, 2004. - С. 58 - 59.
5. Тертичная М.В., Гильмутдинов Р.Я., Сергейчев А.И. Корреляция данных *in vitro* и *in vivo* при Т-2 токсикозе. // Материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 80-летию ФГУП «Щелковский биокомбинат» «Ветеринарная биотехнология: настоящее и будущее» 20 - 23 сентября 2004 г. - Щелково, 2004. - С. 57 - 58.

Подписано в печать 06.04.2005 Заказ № 41 Формат 60x84 1/16. Усл.п.л. 1,25.  
Тираж 100 экз. Отпечатано на офсетном участке ФГУ ВНИВИ (г. Казань).  
Адрес: 420075, г. Казань, Научный городок-2.



951

19 МАЙ 2005