

На правах рукописи

ТЕРТИЧНАЯ МАРИЯ ВАДИМОВНА

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР ПРИ ИЗУЧЕНИИ
ДЕЙСТВИЯ Т-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** ~~июня~~ 2005 г. в **10⁴⁰** 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 **16** ~~июня~~ 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; Дядищев 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 (MDBK), свиньи (СПЭВ), овцы (ППЭО) и собаки (MDCK);
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 MDCK. 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 IC₅₀ 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 ВНИПМИ, 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 биокомбинат» «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

T-2 и НТ-2 токсинов;

возможность использования КК для предварительного скрининга препаратов с потенциально антидотными свойствами при T-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 гибридомной 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 С, перед использованием размораживали и культивировали при +37°C до нормализации ростовых свойств.

Культивирование проводили в стандартных условиях монослойно при температуре 37°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 дисперсировали 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 ВНИИВИ (г. Казань) с.и.х. Сергеичевым А.И., не отличающиеся по физико-химическим и токсическим свойствам от существующих стандартов. В качестве продуцента использовали штамм 2t-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 посевных 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 засевенных; индекса цитотоксичности (ИЦ) (Дьяконов Л.П. и др., 2000) - отношение числа изначально засевенных к числу живых, оставшихся после экспозиции с токсином; плотности клеточной популяции (1111) — количество клеток в 1 мл; цитотоксического индекса ШТИ (Червонская Г.П. и др., 1988) определяемого по формуле:

$$\text{ЦТИ} = \frac{a - b}{a}$$

где: a - % 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 10^6 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 (натрия селенита и ксимедона) Т-2 токсин применяли в дозе LD₅₀. Натрия селенит в дозах 0,1-0,15 мг/кг вводили внутрижелудочно за 3-е суток до затравки. Ксимедон вводили в дозах 50, 100 и 200 мг/кг также внутрижелудочно 3-х кратно (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 (M), 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 сливаются 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), IC₅₀ DC₁₀₀ 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.Л. и др., 1988).

IC₅₀ - доза вещества, при которой гибнет 50% клеток по сравнению с контролем. ЦИ при этом должен быть равен около 0,5.

IC₁₀₀ - 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
MDBK	1,07×10 ⁻⁶	0	0,4±0,1***		-134,9±70,9	0
	2,08×10 ⁻⁹	96,3±1,2**	2,1±0,1***	0,50±0,03***	-3,6±1,9	0,50±0,03
	0,26×10 ⁻⁹	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		
MDCK	0,54×10 ⁻⁶	0	0,6±0,1***		-124,9±51,3	0
	2,08×10 ⁻⁹	97,1±0,6*	2,2±0,1***	0,47±0,02***	-2,5±1,1	0,50±0,02
	0,26×10 ⁻⁹	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		
СЛЭВ	26,82×10 ⁻⁶	0	0,2±0,1***		-113,9±22,8	0
	1,03×10 ⁻⁹	96,2±0,4***	2,1±0,1***	0,49±0,01***	-2,6±0,7	0,50±0,01
	0,13×10 ⁻⁹	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		
ППЭО	0,54×10 ⁻⁶	0	0,9±0,1***		-93,6±26,4	0
	4,18×10 ⁻⁹	97,7±0,3**	1,8±0,1***	0,55±0,01***	-1,2±0,6	0,50±0,01
	0,51×10 ⁻⁹	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 $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$ и $p \leq 0,001$.

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		
	$IC_{100} \times 10^{-6}$	$IC_{50} \times 10^{-9}$	$MPD \times 10^{-9}$
MDBK	1,07	2,08	0,26
MDCK	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 MDBK и MDCK 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 Laufraite 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 $4,72 \times 10^{-8}$ М, для соединительнотканых клеток мыши - $23,4 \times 10^{-9}$ М. При 27 часовой экспозиции клеток костного мозга мыши IC_{50} составила $0,86 \times 10^{-3}$ 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_{100} 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 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
MDBK	4,72x10 ⁻⁵	0	0,4±0,1***		-105,4±34,5	0
	0,88x10 ⁻⁶	97,2±0,3**	2,0±0,1***	0,50±0,01***	-1,8±0,8	0,50±0,01
	1,47x10 ⁻⁷	98,9±0,4	4,0±0,1	0,25±0,01	-0,04±0,02	1,00±0,02
	Контроль	98,9±0,4	4,0±0,1	0,25±0,01	98,9±0,4	
MDCK	3,54x10 ⁻⁵	0	0,6±0,1***		-110,5±32,9	0
	0,59x10 ⁻⁶	97,5±0,5**	2,2±0,1***	0,48±0,01***	-1,7±0,3	0,50±0,01
	1,47x10 ⁻⁷	98,9±0,3	4,2±0,1	0,24±0,01	-0,08±0,03	0,99±0,03
	Контроль	99,0±0,3	4,2±0,1	0,24±0,01		
СПЭВ	4,72x10 ⁻⁵	0	0,2±0,1***		-106,8±21,6	0
	0,59x10 ⁻⁶	96,8±0,5***	2,1±0,1***	0,50±0,01***	-2,4±0,7	0,50±0,01
	0,75x10 ⁻⁷	98,9±0,2	4,1±0,1	0,25±0,01	-0,05±0,02	1,00±0,01
	Контроль	99,0±0,2	4,1±0,1	0,25±0,01		
ПГЭС	2,36x10 ⁻⁵	0	0,9±0,1***		-93,8±31,9	0
	1,18x10 ⁻⁶	97,4±0,8*	1,9±0,1***	0,54±0,01***	-1,4±0,9	0,50±0,02
	0,75x10 ⁻⁷	98,8±0,4	3,7±0,1	0,27±0,01	-0,05±0,02	1,00±0,03
	Контроль	98,8±0,4	3,7±0,1	0,27±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		
	$IC_{100} \times 10^{-5}$	$IC_{50} \times 10^{-6}$	$MPD \times 10^{-7}$
MDBK	4,72	0,88	1,47
MDCK	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_{50} - для линий MDBK и СПЭВ, IC_{50} - для MDCK и СПЭВ, МПД - для MDBK и MDCK. 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_{50} для последнего составляла 10^{-9} М, то для НТ-2 токсина эта же доза равнялась 10^{-6} М. Данная тенденция прослеживается и в опытах *in vivo*, хотя для НТ-2 токсина определена LD_{50} 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 MDBK, MDCK, 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_{50} уже через 24 часа количество живых клеток в линиях MDBK, MDCK 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 IC50 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 сelenита в качестве потенциального антидота Т-2 токсина

Общеизвестно выраженное антиоксидантное действие натрия сelenита. 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 сelenита при введении животным Т-2 токсина в дозе LD₅₀. Результаты исследования представлены в табл. 5.

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

Доза препарата, мг/кг	Эффективность,		
	пали	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 сelenит 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 сelenита 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 LD₅₀. 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 IC₅₀ (2,08x10⁻⁹ М) и фармакологических средств с потенциальными антидотными свойствами (натрия селениита и ксимедона) на клеточную линию MDBK.

Одновременно с внесением токсина вводились спиртовые растворы натрия селениита 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 1C₅₀ и в сочетании с ксимедоном и натрия селенитом

Внесенные вещества	МДА, мкМ/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 селениита увеличивается в меньшей степени. Так, при сочетании Т-2 токсина с ксимедоном концентрация МДА возрастает в 4 раза, а при использовании натрия селениита - 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 слабо выраженную 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 $0D3x10^{-9}$ М (для линии СПЭВ) до $0,51x10^{-9}$ М (для линии ППЭО), что на порядок ниже использующихся на сегодня в токсикологических исследованиях биологических пробах.

Кроме того, исследование цитотоксичности на перевиваемых культурах клеток позволяет значительно сократить сроки исследования. Так, при наличии микротоксина 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.

18

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^{19} М, тогда как для НТ-2-Ю^М.
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 кожной 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 Заяз № 41 Формат 60x84,1/16. Усл.п.л. 1,25.
Тираж 100 экз. Отпечатано на офсетном участке ФГНУ ВНИВИ (г. Казань).

Адрес: 420075, г. Казань, Научный городок-2.

951

19 МАЙ 2005