

УДК 57.086.83:614.48

ВСТАНОВЛЕННЯ ПОРОГОВОЇ КОНЦЕНТРАЦІЇ ТА МУТАГЕННОСТІ ДЕЗІНФЕКЦІЙНОГО ЗАСОБУ ДЛЯ КУЛЬТУР КЛІТИН

Якубчак О.М., Загребельний В. О., Адаменко Л. В.

Національний університет біоресурсів і природокористування України, м. Київ

Унаслідок впливу ксенобіотиків на організм у останнього залежно від дози та тривалості впливу розвиваються адаптаційні процеси або токсичні реакції. Система гігієнічного нормування ксенобіотиків побудована на тому, що для кожної речовини існує певний рівень доз або концентрацій (так звані порогові або мінімально ефективні величини), нижче яких незалежно від тривалості взаємодії речовини з організмом будь-яких проявів її шкідливої дії не виникатиме [1].

Механізм токсичної дії багатьох груп дезінфектантів у більшій чи меншій мірі вивчений, на підставі чого ґрунтується їх сучасна регламентація в об'єктах навколишнього середовища (воді, повітрі робочої зони тощо). Проте вплив дезінфекційних засобів на організм людини та тварини при тривалому надходженні разом з харчовими продуктами та кормами є недостатньо вивченим.

У перелік необхідних тестувань нового Європейського законодавства REACH (реєстрація, експертиза та авторизація хімічних речовин), що почало діяти з 2007 року, на рівні з дослідими *in vivo* обов'язково включені тестування *in vitro*, без яких подальший розгляд документів для реєстрації речовини є неможливим [2].

Метою дослідження було вивчення цитотоксичного впливу дезінфекційного засобу на культуру клітин лінії недрібноклітинного раку легень, дослідження мутагенної дії мікроядерним методом.

Матеріали та методи. Діючою речовиною досліджуваного дезінфекційного засобу є ізопропіловий спирт та бензалконію хлорид.

Цитотоксичні властивості препарату, його здатність впливати на виникнення патологій, пов'язаних зі зміною структури й функціонування клітин, вивчали на клітинній лінії недрібноклітинного раку легень людини – А-549.

Досліджувані клітини А-549 (отримані з Банку клітинних ліній ІЕПОР ім. Р.Є.Кавецького НАН України) культивували в повному поживному середовищі RPMI 1640 ("SIGMA", США), що містить 4 ммоль/л L-глутаміну, 10 % ембріональної сироватки теляти ("SIGMA", США), 40 мкг/мл гентаміцину у зволоженій атмосфері з 5 % CO₂ при 37 °С в матрицях (SenteLab, Україна). Заміну середовища проводили кожні 2 доби. Пересів клітин здійснювали за допомогою розчину Версена при утворенні клітинами на субстраті суцільного моношару (4–5-та доба росту).

Для дослідження чутливості клітин до дезінфекційних препаратів суспензію клітин висаджували на 96-лункові планшети в концентрації 5х10³ - 1х10⁴ клітин/лунку в 100 мкл повного поживного середовища. Через 24 год. вносили досліджувані сполуки та інкубували клітини за стандартних умов 24 год., після чого фарбували клітини за допомогою МТТ, нейтрального червоного та сульфородаміну. Результати досліді реєстрували за допомогою мультилункового спектрофотометру при довжині хвилі 540 нм.

При визначенні мутагенності клітини (2х10⁴ клітин /см³) інкубували з досліджуваною речовиною протягом 48 год., після чого клітини відокремлювали від субстрату, підраховували їх кількість та відмивали за допомогою фосфатного сольового буферу. Одержані клітини інкубували 20 хв. у розчині КСІ (0,56 %) («Реахим», Україна) при 37°С. Потім клітини фіксували сумішшю метилового спирту (Lachema, Чехія) та оцтової кислоти («Макрохим», Україна) (3:1). Фіксовані клітинні суспензії розкапували на холодні мокрі скельця, висушували і фарбували барвником Гімза («Merck», Німеччина). Цитогенетичні препарати аналізували за допомогою біокулярного мікроскопу Carl Zeiss, AxioStarPlus (Німеччина) при збільшенні у 1000 разів.

Кількість мітозів (МІ), частоту появи двоядерних клітин (ДК), одноядерних клітин з мікроядрами (КМЯ), та ядер з протрузіями (хвостаті ядра, гантелеподібні ядра) з розрахунку на 1000 клітин виражали в промілях (%). Статистичну достовірність оцінювали за критерієм Ст'юдента (tS).

Результати досліджень. На першому етапі даного експерименту визначали ступінь цитотоксичності різних концентрацій дезінфекційного засобу та встановлювали оптимальні дози препарату, які б не викликали швидкої деструкції клітин моношару, що дозволило б вивчити характер мітотичних процесів у досліджуваних культурах при внесенні препарату в живильне середовище. З цієї метою готували десятикратні розведення дезінфекційного препарату від 0,01 до 10⁴ мкг/см³ середовища.

Встановлено, що під дією дезінфекційного засобу у концентраціях 10³-10⁴ мкг/см³ спостерігалися повна деструкція моношару, склеювання клітин, грануляція цитоплазми та руйнування морфологічної структури (табл. 1, рис. 1)

Таблиця 1 – Порівняння показників цитотоксичного впливу дезінфекційного препарату на клітини лінії А-549

Тести	Показники життєздатності клітин, %								
Тест з МТ	100	70	52	16,4	12	13	12	0	0
Тест з НЧ	100	100	100	39	20	21	18	0	0
Тест з СР	100	100	74	46,8	27,7	18	14	0	0
Концентрація, мкг/см ³	0,01	0,1	1	10	100	1000	10000	40000	100000

Дані щодо цитотоксичності дезінфекційного засобу, отримані для різних культур клітин, були підтверджені у трьох тестах, які не відрізнялися між собою за чутливістю (коефіцієнт кореляції – 0,9).

За розрахунками, проведеними на підставі отриманих даних, IC₅₀ досліджуваного препарату становить 29,24±2,5 мкг/см³, IC₁₆ становить 80,1±12,1 мкг/см³, IC₉₀ – 136,1±13 мкг/см³.

Таким чином, дезінфекційний препарат не викликає змін у культурі клітин А-549 у дозі 0,001 мкг/см³ протягом 24 год., що і є порогом гострого впливу. У зв'язку з тим, що високі концентрації дезінфекційного препарату викликають значний цитотоксичний ефект, для визначення мітотичної активності та кількості патологічних мітозів були підібрані найбільш оптимальні дози препарату.

Внесені концентрації дезінфекційного препарату не спричинили значних пошкоджень клітин моношару і дозволили вивчити характер перебігу мітотичних процесів культури

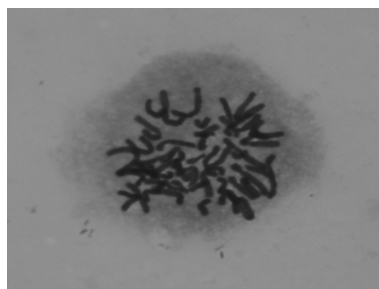
Таким чином, внесення в культуральне середовище дослідної речовини впливає на стабільність хромосомного апарату клітин, зменшує кількість мітозів. Оскільки частота появи мікроядер відображає рівень хромосомних аберацій, підвищення кількості клітин з мікроядрами, порівняно з контролем, свідчить про генотоксичність речовини, яка, зв'язуючись з нуклеотидами, порушує водневі зв'язки і дестабілізує структуру ДНК. Дослідна речовина впливає на структури цитоскелету та веретена поділу, при цьому спостерігається збільшення частоти двоядерних клітин та зниження проліферації пухлинних клітин, тобто уповільнюються темпи клітинного поділу. Такі висновки можна зробити, порівнюючи співвідношення кількості мітозів і двоядерних клітин на 1000 клітин. Такі зміни, як збільшення двоядерних клітин та зупинка клітинного циклу в G2/M фазі, можуть бути пов'язаними з відновленням пошкодженої ДНК. Одночасно виявляли збільшення кількості клітин з різноманітними ядерними протрузіями – ядерними аномаліями, такими як каріорексис, хвостаті ядра, ядра атипової форми, гантелеподібні ядра тощо.



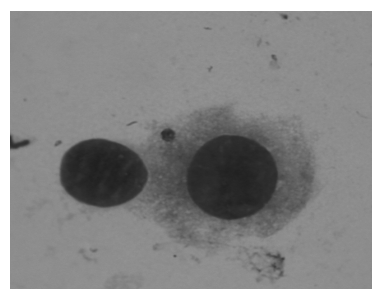
Рис. 1 Порівняння показників цитотоксичного впливу дезінфекційного препарату на клітини А-549 за результатами трьох тестів

Таблиця 2 – Вплив дезінфекційного засобу на культуру клітин, $M \pm m$

Концентрація	Клітини з (мікроядрами), ‰	Двохядерні клітини, ‰	Мітози, ‰	Клітини з протрузіями, ‰
Контроль	$6,3 \pm 0,33$	$2,3 \pm 0,33$	$23,6 \pm 0,88$	$4,0 \pm 0,57$
1000 мкг/см^3	$13,6 \pm 1,76$	$4,3 \pm 0,33$	$2,6 \pm 0,88$	$8,3 \pm 0,33$
$0,001 \text{ мкг/см}^3$	$8,3 \pm 1,2$	$2,3 \pm 0,88$	$18 \pm 1,73$	$4,3 \pm 0,33$

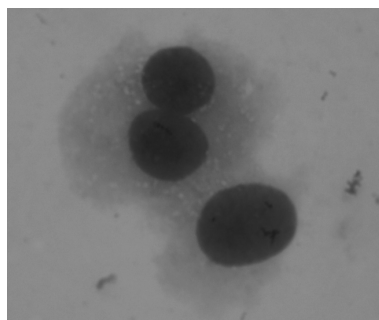


а)

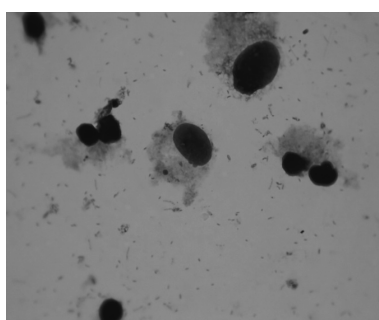


б)

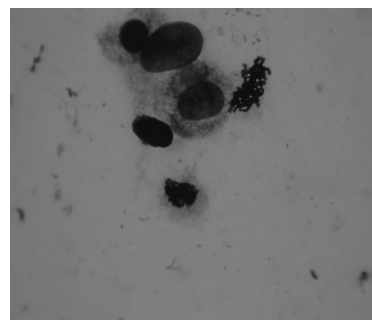
Рис. 2 а, б. Фази мітотичного циклу (контроль) (x1000)



а)



б)



в)

Рис. 3 Вплив дезінфекційного препарату на клітини: а) двохядерні клітини (контроль), б) двохядерні клітини та ядра з протрузіями, в) аномалії мітозу

Порушення цілісності структури ДНК, відставання окремих хромосом в процесі мітозу, затримка деяких фаз мітозу, чисельні ядерні зміни свідчать про мутагенну дію досліджуваного засобу і в подальшому можуть призвести до загибелі клітин.

Мутагенна дія окремих складників дезінфекційного засобу встановлена і іншими дослідженнями [3].

Дія досліджуваного засобу на клітини лінії А549 в концентраціях, при яких не спостерігається цитотоксичний ефект, стан хромосомного апарату суттєво не змінюється за всіма цитогенетичними характеристиками. Тобто, при низьких ($0,001$ - $0,1 \text{ мкг/см}^3$) дозах досліджуваного засобу на клітини лінії А-549 не відбувається кластогенних порушень та змін клітинної проліферації. Отже, в такій концентрації дезінфектант є безпечним.

Висновки.

1. IC_{50} досліджуваного препарату становить $29,24 \pm 2,5 \text{ мкг/см}^3$, IC_{16} становить $80,1 \pm 12,1 \text{ мкг/см}^3$, IC_{90} – $136,1 \pm 13 \text{ мкг/см}^3$.

2. Досліджуваний дезінфекційний препарат має генотоксичну дію на клітини лінії А549 *in vitro*. При цьому спостерігається стрімке збільшення кількості клітин з мікроядрами, ядер з протрузіями та зниження проліферації. Складники дезінфекційного засобу впливають і на структури, що відповідають за процеси ділення, призводить до уповільнення процесів поділу.

3. Дози дослідної речовини (0,001-0,1 мкг/см³), які не впливають на загибель клітин лінії A549 *in vitro*, не мають генотоксичного та мутагенного ефекту.

Список літератури

1. Штабський, Б.М. Ксенобіотики, гомеостаз і хімічна безпека людини / Б.М. Штабський, М.Р. Гжегоцький – Львів, «Наутікус», 1999. – 308 с.
2. Регламент (ЕС) № 1907/2006 Европейского парламента и Совета от 18 декабря 2006 года по регистрации, оценке, авторизации и ограничению химических веществ (REACH), создание Европейского химического агентства, вносящая изменения в Директиву 1999/45/ЕС и отменяющее Регламент Совета (ЕЭС) № 793/93 и Регламент Комиссии (ЕС) № 1488/94, а также Директивы Совета 76/769/ЕЕС и Директивы Комиссии 91/155/ЕЕС, 93/67/ЕЕС, 93/105/ЕС и 2000/21/ЕС. 3. Ammonium, alkyl dimethylbenzylchloride <http://www.chemcas.com>. 4. ICCVAM (2001) Report of the International Workshop on In Vitro Methods for Assessing Acute systemic Toxicity. ICCVAM-NICEATM workshop, Arlington, VA, USA. – 2000. – NIH Publication No. 01-4499. – P. 370

DEFINITION OF THRESHOLD CONCENTRATION AND MUTAGENIC DISINFECTANT FOR CELL CULTURES

Yakubchak O.M., Zagrebelny V.O., Adamenko L.V.

National University of Life and Environment Sciences of Ukraine, Kyiv

The experiments conducted in vitro using cultures of human cells (cell line non-small cell lung cancer) to install the cytotoxicity and mutagenicity of disinfectant. In comparative studies used three basic tests, which assessed the viability of the cells and the micronucleus test.