

Н. М. Жолобак, Т. Г. Лысенко

Цианобактерия *Synechococcus cedrorum* — тест-культура для биоиндикации токсичности новых химически синтезированных лекарственных веществ*(Представлено членом-корреспондентом НАН Украины Н. Я. Спиваком)*

*Обґрунтовано використання цианобактерій як тест-об'єктів для скринінгу нових лікарських протівірусних препаратів. Показано чітку кореляцію токсичності досліджених сполук для культури *Synechococcus cedrorum* і контрольної тест-культури, що стандартно використовується для вивчення властивостей новосинтезованих сполук. Запропонована тест-система цианобактерія *S. cedrorum* — нова, екологічно безпечна, оперативна, технологічна, а також адекватна іншим сучасним методам діагностики.*

Важнейшее требование при разработке и создании новых лекарственных препаратов — анализ и изучение их токсичности. Это первый и необходимый этап скрининга синтезированных соединений. До настоящего времени с этой целью используют целый ряд чувствительных биологических тестов. Исследования проводят как с использованием первично трипсинизированных или перевиваемых культур клеток и тканей, так и на подопытных животных [1]. Ввиду фундаментальных различий в анатомии, физиологии, патологии и метаболизме человека и животных данные об эффективности и токсическом действии лекарственных препаратов, получаемые на моделях с использованием животных, часто не находят адекватного подтверждения в клинике. К тому же вариабельность видов, линий, возраста, пола, массы используемых животных, факторов внешней среды часто приводят к ошибочным результатам, что является основанием для постепенного отказа на международном уровне от показателя ЛД₅₀ [2].

Наблюдения и практика проведения в доклинических исследованиях токсикологической экспертизы позволяют утверждать, что внедрению альтернативных моделей для прогнозирования потенциальной токсичности соединений уделяется еще недостаточно внимания [3]. Именно поэтому актуальным представляется поиск новых тест-объектов, обеспечивающих результативное и надежное биотестирование. Наиболее надежными являются многокомпонентные системы биотестирования, включающие в свой состав высокочувствительные прокариотические и эукариотические организмы, всесторонне изученные и хорошо растущие в лабораторных условиях, тест-реакция которых не требует использования сложной и дорогостоящей аппаратуры, но в то же время несущие достаточный объем информации. Поскольку первый этап скрининговых исследований для прогнозирования острой токсичности в условиях *in vitro* предполагает определение общего цитотоксического действия на основе оценки ингибирования пролиферации клеток, лучшим объектом для этого является недифференцированная линия клеток, способных к быстрому делению.

Цель наших исследований — разработка нового тест-объекта для биоиндикации токсичности синтезированных химических соединений различной природы с использованием в качестве тест-культуры цианобактерии *Synechococcus cedrorum* — представителя широ-

ко распространенной группы микроорганизмов с уникальными физиолого-биохимическими свойствами [4]. Выбор этой культуры был основан на ранее полученных данных о ее высокой чувствительности, по сравнению с другими испытанными культурами цианобактерий различных таксономических групп, к действию комплексных препаратов стахиботриотоксинов. Ее тест-реакция коррелировала с результатами биотестирования с помощью других индикаторных тест-объектов: дрожжей, зеленых водорослей (*Chlorella*), кролей [5].

Материалы и методы. В работе использовали аксеничную культуру клеток цианобактерий *S. cedrorum* CALU 750, полученную из коллекции Биологического института Санкт-Петербургского госуниверситета. Культуру выращивали в лабораторных культиваторах на среде BG-11 [6] в стерильных условиях с аэрацией воздухом при 25–27 °С, рН 9,5–10,5, освещенности 1500–2000 лк и с начальной плотностью посева 0,25 ОП при длине волны 610 нм. В эксперименте использовали культуру в поздней логарифмической фазе роста (на 2–3-е сут культивирования). При этом стандартная концентрация клеток не превышала $8 \cdot 10^7$ клеток/мл. Токсичность лекарственных веществ определяли на основании тест-реакции — развития цитопатического эффекта с применением предложенного нами микрометода. С этой целью в 96-луночные планшеты “Calbiochem” вносили последовательные разведения исследуемых веществ и добавляли клетки цианобактерии *S. cedrorum*, дважды отмытые свежей питательной средой (общий объем аликвоты составлял 0,2 мл). Через 24 и 48 ч культивирования при освещенности не более 1000 лк проводили спектрофотометрическое измерение оптической плотности клеточной суспензии на приборе “Labsystem Multiscan” (США) при длине волны $\lambda = 450$ нм. Токсичность исследуемых химических соединений оценивали по проценту погибших клеток, количество которых определяли по калибровочной кривой. Для построения калибровочной кривой использовали прямой подсчет клеток в камере Горяева и одновременное измерение оптической плотности клеточной суспензии. Дифференциацию токсичности препаратов проводили по индексу токсичности фактора (ИТФ) и шкале токсичности, используемой для цианобактерий [7].

По показателям ИТФ концентрации испытанных веществ распределяли по шкале токсичности: I класс — сверхвысокая токсичность, вызывает гибель тест-объекта; II — высокая токсичность (ИТФ < 0,50), т. е. ниже индекса ЛД₅₀, принятого в токсикологии; III — средняя токсичность (ИТФ = 0,50–0,70); IV — низкая токсичность (ИТФ = 0,71–0,90); V — отсутствие токсичности, ИТФ на уровне контроля (ИТФ = 0,91–1,10); VI — стимуляция, величина тест-функций в опыте превышает контрольные значения (ИТФ > 1,1).

Одновременно для сравнения полученных результатов токсичности на *S. cedrorum* изучали действие тех же соединений с помощью другого тест-объекта — культуры клеток перевиваемых тестикул поросят (ПТП; эпителиальные клетки, близкие по своим биологическим характеристикам к человеческим клеткам). Токсичность химических соединений различной природы оценивали по цитопатическому действию [8]. Учет результатов проводили по наличию или отсутствию цитотоксического действия на растущие клетки.

В работе тестировалась токсичность производных флуоренона с различными группами заместителей (табл. 1). Вещества синтезированы мл. науч. сотр. отдела медицинской химии Физико-химического института им. О. А. Богатского НАН Украины А. С. Карпенко.

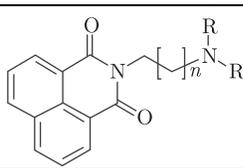
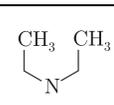
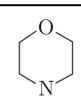
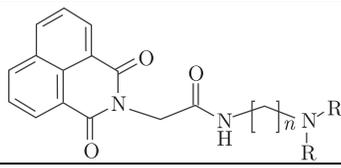
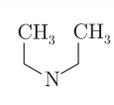
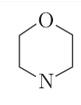
Анализ данных проводили с использованием статистического пакета прикладных программ Статистика +3.5.0. Результаты исследования количественных параметров в группах сравнения определяли как $M \pm m$, где M — средняя арифметическая, m — стандартная ошибка средней. Изменения считались статистически значимыми при уровне значимости $P < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Если для культуры клеток ПТП характерным признаком токсичности является разрушение, деструкция клеточного монослоя, то клетки цианобактерий изменяют окраску культуральной жидкости уже на первых этапах лизиса. Указанный эффект обусловлен массивным выходом из клеток цианобактерий отдельных классов пигментов. Вероятно, что после дополнительного изучения этот эффект может быть также рекомендован как экспресс-критерий для оценки токсичности.

Тестирование соединений с предполагаемыми антивирусными свойствами, относящихся к двум группам производных нафталимидов, показало, что через 18–24 ч с момента их контакта с клетками развивается цитопатический эффект. Результаты изучения токсичности исследуемых веществ в культуре клеток ПТП и в культуре клеток цианобактерий *S. cedrorum* (рис. 1) позволяют сделать вывод о наличии четкой корреляции токсических эффектов на обеих исследованных культурах. Как для культуры клеток ПТП, так и для тест-культуры *S. cedrorum* наименее токсичными оказались соединения, содержащие в своем составе морфолиновую группу. Как следует из приведенных данных, токсические концентрации веществ, определенные для цианобактерий *S. cedrorum* согласно классу токсичности, можно использовать как отправную точку для изучения токсичности исследуемых соединений в культуре клеток ПТП. Полученные результаты подтверждают возможность использования тест-культуры *S. cedrorum* для экспресс-диагностики токсичности веществ с целью дальнейшего изучения их биологического действия на основании уже определенного диапазона концентраций в культуре клеток животных и человека.

Таким образом, предложенную модель с использованием в качестве тест-объекта культуры цианобактерии *S. cedrorum* можно рассматривать как эффективную для определения токсичности с целью предварительной оценки новых антивирусных препаратов. Разработанная тест-система — новая, экономичная, экологически безопасная, оперативная, технологичная, адекватна другим методам диагностики токсичности, используемым в настоящее время в практике медицины и ветеринарии.

Таблица 1. Структурные формулы исследованных производных флуоренона

N-диалкиламиноалкилнафталимиды	NR ₂ =	
		
	Шифр соединения	
	<i>n</i> = 2	1
<i>n</i> = 3	2	4
Диаминоалкиламины нафталимидокарбоновых кислот	NR ₂ =	
		
	Шифр соединения	
	<i>n</i> = 1	5
<i>n</i> = 2	6	8

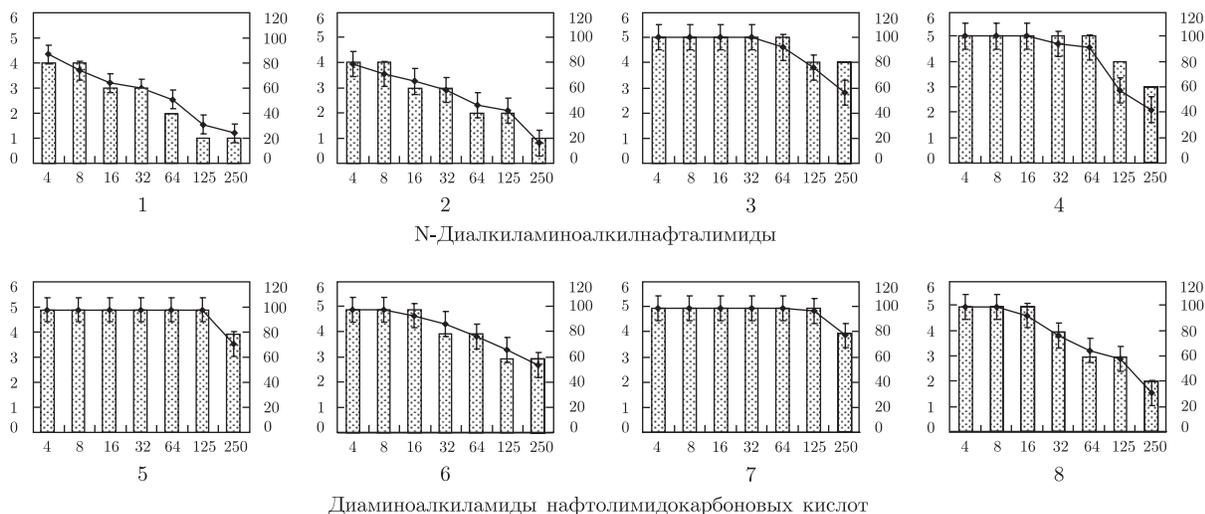


Рис. 1. Токсичность исследованных соединений для использованных культур.

1–8 — шифры соединений (см. табл. 1).

Левая вертикальная ось — класс токсичности, столбики — класс токсичности веществ для культуры *S. cedrorum*; правая вертикальная ось — процент живых клеток в культуре ПТП, кривая — токсичность веществ для культуры клеток ПТП. По оси абсцисс — концентрация исследуемых веществ, мкг/мл

С экономической точки зрения предложенный метод определения токсичности с использованием автоматизированной системы измерения, сокращая сроки получения воспроизводимых и достоверных данных относительно активности большого количества соединений, позволяет ускорить изучение биологических свойств веществ. С другой стороны, выявление токсичности соединений на ранних стадиях испытаний уменьшает финансовые затраты на их изучение.

1. Доклінічні дослідження лікарських засобів. Методичні рекомендації / За ред. О. В. Стефанова: Міністерство охорони здоров'я України. Державний фармакологічний центр. — Київ, 2001. — 392 с.
2. Коваленко В. Н. Альтернативные методы в доклиническом изучении токсичности лекарственных средств // Сучасні проблеми токсикології. — 2002. — № 4. — http://www.medved.kiev.ua/arhiv_mgst_2002/02_4_3.htm.
3. Трахтенберг І. М., Коваленко В. М., Кожишарева Н. В. та ін. Альтернативні методи і тест-системи. Лікарська токсикологія / За ред. І. М. Трахтенберга. — Київ: Авіцена, 2008. — 272 с.
4. Менджул М. И., Нестерова Н. В., Горюшин В. А., Лысенко Т. Г. Цианофаги — вирусы цианобактерий. — Киев: Наук. думка, 1985. — 145 с.
5. Зайченко О. М., Менджул М. И., Лысенко Т. Г. та ін. Використання ціанобактерій для індикації токсичної дії стахіоботріотоксинів // Мікробіол. журн. — 2002. — 64, № 4. — С. 31–39.
6. Колтукова Н. В., Лысенко Т. Г. Влияние некоторых физико-химических факторов на рост *Spirulina platensis* (Gom.) Geit // Альгология. — 1991. — № 1. — С. 4.
7. Кабилов Р. Р., Сагитова Н. В. Разработка и использование многокомпонентной тест-системы для оценки токсичности почвенного покрова городской территории // Экология. — 1997. — № 6. — С. 408–411.
8. Жолобак Н. М., Карпов А. В., Рыбалко С. Л. и др. Сравнительная характеристика цитотоксичности индуцирующего комплекса дрожжевая РНК — тилорон // Антибиотики и химиотерапия. — 1999. — 44, № 4. — С. 21–24.

Інститут мікробіології і вірусології
ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ

Поступило в редакцію 19.12.2008

N. M. Zholobak, T. G. Lysenko

Cyanobacterium *Synechococcus cedrorum* — the test-culture for toxic bioindication of new chemically synthesized medicinal substances

The work is devoted to the substantiation of the use of cyanobacteria as a test-object for the screening of new antiviral medicinal substances. Clear correlation of experimental substances' toxicity between culture of S. cedrorum and control test-cultures which are usually used in the investigation of new synthesized substances' properties is shown. The proposed test-system of cyanobacteria S. cedrorum is new, environmentally safe, operational, technological, and adequate to other diagnostic methods used in current medicine and veterinary practice.