

Демчина О.В.

студент,

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Дмитруха Н.М.

доктор біологічних наук, провідний науковий співробітник;

Лагутіна О.С.

молодший науковий співробітник,

ДУ «Інститут медицини праці імені Ю.І. Кундієва НАМН України»

ОЦІНКА ЦИТОТОКСИЧНОЇ ДІЇ ДЕЗІНФЕКЦІЙНИХ ЗАСОБІВ НА КУЛЬТУРІ КЛІТИН ЛІНІЇ А549

Для знищення патогенної мікрофлори використовують дезінфікуючі засоби (ДЗ), які володіють бактерицидними чи бактеріостатичними властивостями. В той же час ці засоби можуть негативно впливати на здоров'я персоналу, який їх застосовує [1].

За методичними вказівками [2] оцінка безпеки ДЗ повинна включати комплекс токсикологічних досліджень на теплокровних тваринах. Разом з тим в сучасних токсикологічних дослідженнях пупулярність завойовують альтернативної моделі *in vitro*, які мають ряд важливих переваг, зокрема: швидкість отримання результатів, точність, економічність та гуманність [3].

Серед моделей оцінки токсичності *in vitro* перевагу надають культурі клітин, які мають підвищену здатність до ділення, гомогенність та подовжений термін життя. Використання культури клітин *in vitro* дає інформацію про потенційну цитотоксичну дію речовини. На клітинному рівні можна виявити основні механізми токсичної дії речовини, а саме пошкодження клітинних мембран, порушення процесів метаболізму та порушення регуляції поділу клітин [4, 5].

Метою нашого дослідження була оцінка цитотоксичної дії дезінфекційних засобів на культурі клітин А549 в умовах *in vitro*.

Досліджували цитотоксичну дію дезінфікуючих препаратів: Біоблиск, Блиск Плюс і Макс Актив (виробник ГІГІЄНІКС, Польща).

Оскільки при застосуванні ДЗ вони в першу чергу вони потрапляють в легені, то для дослідження були обрані клітини недрібноклітинного раку легень лінії А549, які отримані з клітинного банку Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології імені Р.Є. Кавецького НАН Укаріни.

Клітини культивували у поживному середовищі RPMI 1640 із вмістом 4 ммоль/л L-глутаміну, 10% ембріональної телячої сироватки і 40 мкг/мл гентаміцину. Цитотоксичну активність ДЗ оцінювали за допомогою загально визнаних тестів: МТТ – з тетразолієм блакитним та СРБ – з сульфородаміном Б [6]. Принцип методу МТТ заснований на здатності ферменту сукцинатдегідрогенази мітохондріальної мембрани клітин відновлювати жовту сіль 3 – [4,5-діметілтіазол-2-іл]-2,5-діфенілтетразоліа бромід (МТТ) до кристалів формагану фіолетового кольору, що накопичуються в результаті цієї реакції у цитоплазмі живих клітин. Отже, про рівень мітохондріального дихання клітин можна судити за інтенсивністю накопичення кристалів формагану в цитоплазмі. Тест з сульфородаміном Б – аніонним барвником, заснований на його здатності взаємодіяти з білками клітин, що дозволяє чітко визначити зниження чи підвищення проліферації клітин.

Оцінку результатів в обох тестах, що базується на визначенні кількості життєздатних клітин, проводили за формулою: $KЖК = \frac{ОГ_{ДК}}{ОГ_{КК}} \times 100\%$, де

КЖК – кількість життєздатних клітин, $ОГ_{КК}$ – оптична густина в лунках з контрольними клітинами, $ОГ_{ДК}$ – оптична густина в лунках з дослідними клітинами.

Для обрахунку цитотоксичних концентрацій використовували статистичні програми SPSS та STATISTICA.

Дослідження цитотоксичної дії (вплив на життєздатність клітин) дезінфекційних засобів показали, що найбільшу цитотоксичну активність по відношенню до клітин А 549 за даними МТТ-тесту виявляв Біоблиск, а найменшу Блиск Плюс. Так, за впливу 1% розчину Біоблиску визначено 18,8% живих клітин, Блиску Плюс – 20,6%, Макс Активу – 22,9%. Найменша з досліджуваних концентрацій (0,015%) Біоблиску залишала життєздатними 71,4% клітин, препарату Блиск Плюс -76,9% і Макс Актив – 88,5% клітин.

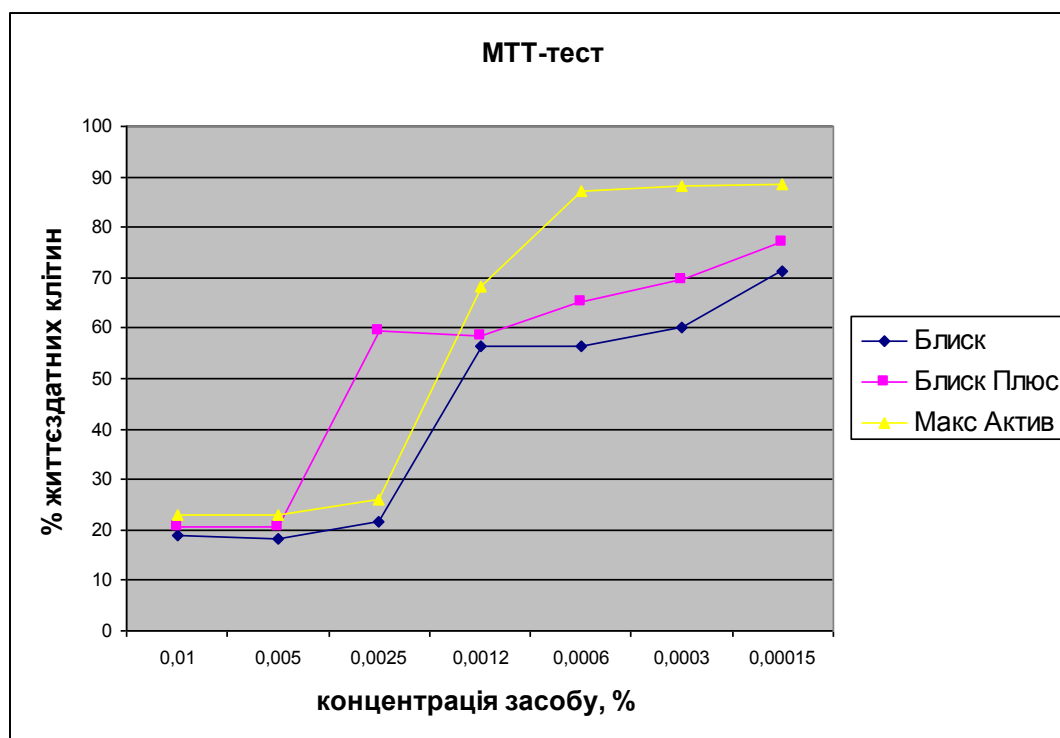
За результатами тесту з сульфородаміном Б найбільшу цитотоксичну дію проявляв 1% розчин Біоблиску (кількість життєздатних клітин була 6,9%), для Макс Активу – 8,3% живих клітин, а найменшу 1% розчин Блиск Плюс – 9,2% живих клітин. Найменша з досліджуваних концентрацій (0,015%) майже не впливала на клітини. Кількість живих клітин за впливу 0,015% розчину Біоблиску залишала життєздатними 82,9%, Блиску Плюс – 86,0%, Макс Активу – 85,6% клітин.

Отже, отримані результати дозволяють дійти наступних висновків:

1. Дані МТТ і СРБ тестів свідчать, що ДЗ у концентрації 1% чинили найбільш виражену цитотоксичну дію, зниження концентрації сприяло зменшенню їх цитотоксичної активності.

2. Цитотоксична дія препаратів в більшій мірі була обумовлена їхнім впливом на процес синтезу білка в клітинах (тест з СРБ).

3. Для Біоблиску значення LC_{50} становили: 0,1% (за даними МТТ-тесту) і 0,15% (за даними тесту з СРБ).

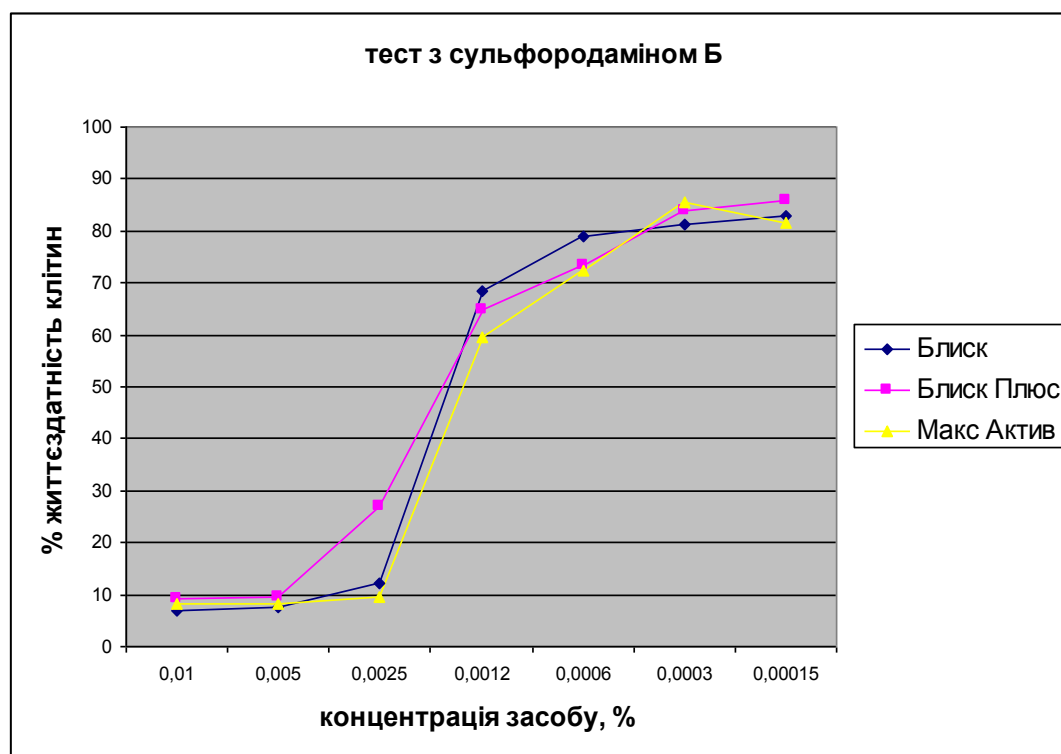


Графік 1. Виживаність клітин А549 за впливу досліджуваних засобі за даними МТТ-тесту

Джерело: розроблено авторами

4. Для препарату Блиск Плюс значення LC_{50} становили: 0,25 % (за даними МТТ-тесту) і 0,2% (за даними тесту з СРБ).

5. Для препарату Макс Актив значення LC_{50} становили: 0,2 % (за даними МТТ-тесту) і 0,2% (за даними тесту з СРБ).



Графік 2. Вживаність клітин A549 за впливу досліджуваних засобі за даними тесту з сульфородаміном Б.

Джерело: розроблено авторами

Список використаних джерел:

1. Влияние дезинфицирующих и антисептических средств на здоровье персонала отделений реанимации http://www.medzapiski.ru/2012/03/blog-post_7018.html
2. Методические указания «Общие вопросы, гигиена, токсикология, санитария, оценка токсичности и опасности дезинфицирующих средств», МУ 1.2.1105–02, 2002. – 23 с.
3. Альтернативні методи і тест-системи. Лікарська токсикологія / І.М. Трахтенберг, В.М. Коваленко, Н.В. Кокшарьова, П.Г. Жмілько та ін. К.: ВД «Авіцена», 2008. – 268 с.
4. Combes R.D. The use of human cells in biomedical research and testing // Altern. Lab. Anim. – 2004. – № 32. – P. 43–49.
5. Optimization and pre-validation of an in vitro test strategy for predicting human acute toxicity / S. Clemedson [et al.] // ALTEX. – 2006. – № 23 (suppl.). – P. 254–258.
6. Якубчак О.М. Встановлення порогової концентрації та мутагенності дезинфекційного засобу для культур клітин / О.М. Якубчак, В.О. Загребельний, Л.В. Адаменко // Ветеринарна медицина. – 2011. – № 95. – С. 88–90.