

ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ И ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НОВОГО ЛЕЙКОЦИТАРНОГО ПОЛИПЕПТИДА

Т.А. Гришина

аспирант, кафедра химии и биотехнологии,
Пермский национальный исследовательский политехнический университет (г. Пермь)
E-mail: tatyana_grishina_1990@mail.ru

А.Г. Волков

к.м.н., кафедра фармакологии,
Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера (г. Пермь)

Л.В. Волкова

д.м.н., профессор, кафедра химии и биотехнологии,
Пермский национальный исследовательский политехнический университет (г. Пермь)

Цель исследования – оценка безопасности низкомолекулярного лейкоцитарного белково-пептидного комплекса (ЛБПК) на этапе доклинического изучения.

Материал и методы. Объектом исследования явился экспериментальный образец нового лейкоцитарного белково-пептидного комплекса (ЛБПК), полученного путем ультразвуковой обработки лейкоцитов человека *in vitro*. Оценку цитотоксичности ЛБПК проводили на клеточной линии эпителиоподобных клеток почки эмбриона свиньи (SPEV) и с помощью МТТ-теста *in vitro* на опухолевых линиях клеток человека НСТ 116 (колоректальная карцинома) и MS (меланома). В качестве оценки влияния на рост клеток лейкоцитарного белково-пептидного комплекса (ЛБПК) использовали индекс пролиферации. Эксперименты по изучению острой токсичности ЛБПК проводили на белых нелинейных мышах, которым вводили препарат внутривенно. Для оценки полученных результатов использовали метод определения средней летальной дозы по Прозоровскому.

Результаты. Установлено, что добавление экспериментального образца лейкоцитарного белково-пептидного комплекса в ростовую среду для культивирования клеточной линии SPEV благоприятно влияло на рост клеток. Индекс пролиферации увеличился от первого до четвертого пассажа в 1,09 раза, в то время как в контрольном образце только в 1,03 раза. Изучение цитотоксичности ЛБПК показало, что образец не проявлял цитотоксического действия в отношении опухолевых клеток НСТ 116 и MS, так как рассчитанные для них концентрации IC_{50} во всех случаях значительно уступали препарату сравнения доксорубину. Результаты оценки острой токсичности на экспериментальных животных показали, что испытуемый образец при внутривенном введении является малотоксичным по классификации ГОСТ 12.1.007.-76 (LD_{50} 3500,0 мг/кг).

Выводы. Изученный белково-пептидный комплекс не проявляет токсического действия на исследуемые линии клеток, а также на лабораторных животных (мышей).

Ключевые слова: цитотоксичность, клеточные линии, лейкоцитарный белково-пептидный комплекс, острая токсичность, мыши.

Для цитирования: Гришина Т.А., Волков А.Г., Волкова Л.В. Цитотоксичность и токсикологическая характеристика нового лейкоцитарного полипептида. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2020;23(5):54–58. <https://doi.org/10.29296/25877313-2020-05-08>

Одним из ключевых этапов исследования новых биологически активных веществ является оценка их безопасности, которая включает в себя исследование токсических свойств с использованием лабораторных животных [1, 2] и цитотоксичности с изучением на клеточных линиях животных и человека [3–5]. Доклиническое изучение новых лекарственных препаратов обеспечивает относительную безопасность проведения клинических исследований для волонтеров или пациентов.

В ФГБОУ ВПО «Пермский национальный исследовательский политехнический университет»

разработан экспериментальный образец нового лейкоцитарного белково-пептидного комплекса (ЛБПК), с использованием на одном из технологических этапов ультразвука определенной мощности (Гришина Т.А., Волкова Л.В., Волков А.Г. «Способ фракционирования лейкоцитарных белков». Заявка № 2019114590 от 13.05.2019). Получены предварительные результаты биологической активности ЛБПК [6].

Цель исследования – оценка безопасности низкомолекулярного ЛБПК на этапе доклинического изучения.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования явился лабораторный образец лиофилизированного препарата ЛБПК, полученного в процессе ультразвуковой кавитации на лейкоциты человека *in vitro*, с последующей очисткой и концентрацией.

Цитотоксичность образца исследовали на монослое линии эпителиоподобных клеток почки эмбриона свиньи (SPEV). Клетки рассевали на 96-луночные плоскодонные планшеты фирмы «Био Лайн» (Россия), вносили 200 тыс. кл/мл в питательной среде 199, содержащей антибиотик (100 мкг/мл канамицина сульфата) и 10%-ную сыворотку крупного рогатого скота, затем инкубировали в условиях CO₂-инкубатора при постоянной температуре 37 °С. Мониторинг клеточной популяции проводили под инвертированным микроскопом. Оценивали качественные и количественные клетки в сравнении с интактными (необработанным препаратом лейкоцитарного пептида) методом подсчета клеток в камере Горяева.

Для оценки влияния ЛБПК на рост клеток использовали индекс пролиферации (ИП). Для расчета ИП осуществляли четыре последовательных пассажа с уровнем содержания лейкоцитарного пептида 30% от общего объема питательной среды. Количество клеток в каждом пассаже определяли подсчетом в камере Горяева под микроскопом при 100-кратном увеличении.

Индекс пролиферации вычисляли по формуле

$$\text{ИП} = \frac{K}{C_{\text{исх}}},$$

где K – общее количество клеток в культуральном флаконе; $C_{\text{исх}}$ – начальная нагрузка на культуральный флакон.

Цитотоксичность ЛБПК изучали *in vitro* на опухолевых линиях клеток человека НСТ 116 (колоректальная карцинома) и MS (меланома) (предоставлены зав. лабораторией биологически активных соединений Института технической химии УрО РАН к.х.н. В.В. Гришко). Культуру клеток культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамин и 1% антибиотиков при 37 °С и 5% CO₂ во влажной атмосфере. Цитотоксичность определяли с помощью МТТ-теста [7]. В качестве количественного критерия цитотоксичности тестируемых препаратов рассчитывали значение IC₅₀ (концентрация тестируемого соединения, которая вызывает гибель 50% клеток)

на основе дозозависимых кривых с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 6.0.

Исследования острой токсичности на животных проведены на белых нелинейных мышам-самцах с массой тела 24,0–26,0 г (предоставлены зав. кафедрой физиологии Пермской государственной фармацевтической академии, к.м.н. И.П. Рудаковой). Исследуемый образец вводили внутрибрюшинно в нескольких дозах. Животных делили на группы по 2 мыши в каждой. Каждой паре вводили одну дозу в порядке возрастания 2500,0; 3160,0; 3980,0; 5000,0 мг/кг. Для расчета LD₅₀ использовали результаты, полученные на 8 мышах. Препарат для внутрибрюшного введения растворяли в изотоническом растворе натрия хлорида. Контрольным животным вводили раствор натрия хлорида внутрибрюшинно.

Исследования выполнены в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей [8]. Протокол биоэтической комиссии от 12.09.2018 г.

Для оценки полученных результатов использовали метод определения средней летальной дозы по Прозоровскому [9].

Полученные результаты обрабатывали с использованием t -критерия Стьюдента и представляли в виде доверительных границ ($X \pm \Delta x$) при уровне достоверности $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве основного показателя оценки цитотоксичности лейкоцитарного пептида взят индекс пролиферации клеток (ИП), который определяли после каждого пассажа на клеточной линии SPEV (табл. 1). Как известно, ИП – безразмерная величина, показывающая, насколько возросло количество клеток по сравнению с исходным [10].

Анализ полученных результатов показал, что добавление экспериментального образца ЛБПК в ростовую среду для культивирования клеточной линии SPEV благоприятно сказывается на количестве культивируемых клеток.

Индекс пролиферации увеличивался от первого до четвертого пассажа в 1,09 раза, в то время как в контрольном образце увеличение ИП произошло в 1,03 раза.

Проведена оценка морфологии клеточной линии SPEV, используемой для оценки ИП исследуемых составов питательной среды (рис. 1).

Таблица 1. Сравнительный анализ значений ИП клеточной линии SPEV при культивировании ее на питательных средах различного состава

Условия культивирования	Номер пассажа				Степень увеличения ИП
	1	2	3	4	
Клеточная линия SPEV на стандартной питательной среде (контроль)	8,8	8,9	8,9	9,1	1,03
Клеточная линия SPEV на питательной среде с 30%-ным содержанием лейкоцитарных пептидов	8,5	8,9	9,1	9,3	1,09*

Примечание: * – уровень достоверности $p \leq 0,05$.

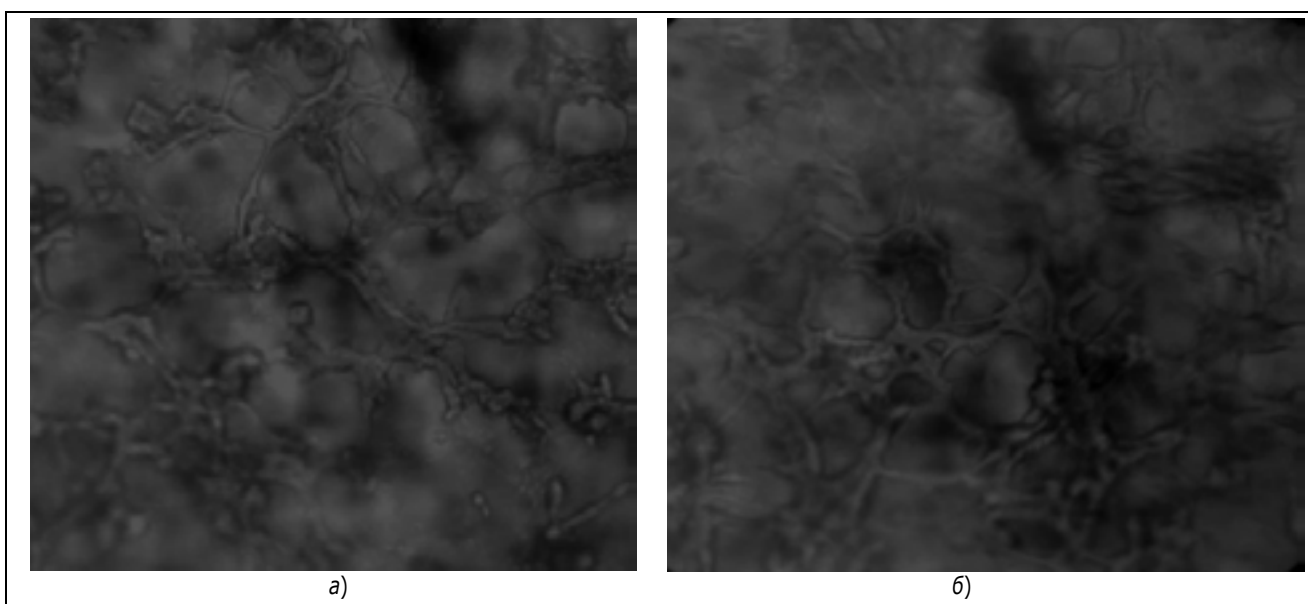


Рис. 1. Монослой клеток SPEV, содержащей 30% лейкоцитарных пептидов от общего объема среды: а – культивируемых на стандартной питательной среде; б – культивируемых на питательной среде, содержащей 30% лейкоцитарных пептидов от общего объема среды

Таблица 2. Оценка уровня цитотоксичности лейкоцитарного белково-пептидного комплекса

Объект	Концентрация IC ₅₀ , мкг/мл	
	ЛБПК	Контроль положительный (доксорубин)
Клеточная линия НСТ 116 (колоректальная карцинома)	77,56±10,84	0,29±0,05
Клеточная линия MS (меланома)	3155,0±645,0	0,7±0,09

Использование ЛБПК в качестве компонента питательной среды при культивировании клеток SPEV продемонстрировало хорошие показатели без признаков токсического воздействия среды, сформирован сплошной монослой, идентичный контрольной культуре клеток.

Добавление лейкоцитарных пептидов в питательную среду не угнетало рост клеточной линии

SPEV, а напротив, вызвало нарастание количества клеток. Клетки, культивированные на питательной среде с добавлением 30% ЛБПК, имели правильную округлую форму без признаков деформации.

Критерием отсутствия цитотоксичности можно считать и оценку действия ЛБПК на опухолевые линии клеток человека (табл. 2).

Таблица 3. Оценка острой токсичности ЛБПК на животных (мыши)

Введенная доза ЛБПК, мг/кг	Гибель животных, шт./число животных в эксперименте
2500	0/2
3160	1/2
3980	1/2
5000	2/2
Контроль	0/2

Полученные данные показали, что исследуемый образец ЛБПК не проявлял цитотоксического действия в отношении опухолевых клеток НСТ 116 и MS, так как рассчитанные для них концентрации IC_{50} во всех случаях значительно уступали препарату сравнения доксорубинину.

Общее состояние подопытных животных при исследовании острой токсичности экспериментального образца ЛБПК оценивали визуально по поведенческим реакциям, внешнему виду и выживаемости. Данные эксперимента представлены в табл. 3.

Полученные результаты записывали в виде последовательности реакций: 0112. Эти данные заносили в таблицу, в которой на пересечении данной строки с колонкой, где указана наименьшая из использованных доз – 2500 мг/кг, находили LD_{50} . Таким образом, летальная доза составила 3500 (2900–4200) мг/кг.

Согласно общепринятой гигиенической классификации (ГОСТ 12.1.007.-76), испытуемый образец ЛБПК при внутрибрюшном введении относится к 4-му классу опасности (вещества малоопасные).

ВЫВОДЫ

Результаты исследования безопасности нового лейкоцитарного белково-пептидного комплекса показали, что при однократном внутрибрюшном введении ЛБПК не оказывает общетоксического действия и является малотоксичным веществом по ГОСТ 12.1.007.-76, а также не обладает цитотоксическим действием на перевиваемую клеточную линию SPEV и опухолевые клеточные линии человека НСТ 116, MS.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Енгальчева Г.Н., Сюбаев Р.Д., Васильев А.Н., Снегирева А.А., Верстакова О.Л.* Оценка фармакологической безопасности лекарственных средств в доклинических исследованиях. Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения. 2013; 1: 10–13.
2. *Миронов А.Н.* Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средства. М.: Гриф и К, 2012. С. 347–69.
3. *Еропкин М.Ю., Еропкин Е.М.* Ферментативные методы оценки цитотоксичности на модели клеток человека в культуре: динамика лактатдегидратазы и глутатиондегидратазы под действием различных концентраций ДДС-На. Токсикологический вестник. 1997; 5: 26–32.
4. *Morita M., Naito Y., Yoshikawa T., Niki E.* Plasma lipid oxidation induced by peroxynitrite, hypochlorite, lipoxygenase and peroxy radicals and its inhibition by antioxidants as assessed by diphenyl-1-pyrenylphosphine. Redox Biology. 2016; 8: 127–135.
5. *Романова М.А., Додонова А.Ш.* Изучение цитотоксичности биологически активных соединений в культуре клеток. Молодой ученый. 2016; 18: 110–114.
6. *Волкова Л.В., Гришина Т.А., Волков А.Г.* Фракционный состав лейкоцитарного лизата и его биологические свойства. Современные проблемы науки и образования. 2019; 1. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=28527>.
7. *Bernas T., Dobrucki J.* Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes. Cytometry. 2002; 47(4): 236–242.
8. *Большаков О.П., Незнанов Н.Г., Бабаханян Р.В.* Дидактические и этические аспекты проведения исследований на биомоделях и на лабораторных животных. Качественная клиническая практика. 2002; 1: 58–61.
9. *Прозоровский В.Б., Прозоровская М.Н., Демченко В.М.* Экспресс-метод определения средней эффективной дозы и ее ошибки. Фармакология и токсикология. 1978; 4: 497–502.
10. *Фреши Р.Я.* Культура животных клеток. М.: Лаборатория знаний, 2018. С. 145–157.

Поступила после доработки 16 апреля 2020 г.

CYTOTOXICITY AND TOXICOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE NEW LEUKOCYTAR POLYPEPTIDE

© Authors, 2020

T.A. Grishina

Post-graduate Student,

Department of Chemistry and Biotechnology, Perm National Research Polytechnic University (Perm)

E-mail: tatyana_grishina_1990@mail.ru

A.G. Volkov

Ph.D. (Med.),

Department of Pharmacology, Perm State Medical University name acad. E.A. Vagner (Perm)

L.V. Volkova

Dr.Sc. (Med.), Professor,

Department of Chemistry and Biotechnology, Perm National Research Polytechnic University (Perm)

The aim of the study is to assess the safety of a low molecular weight leukocyte protein-peptide complex (LPPC) at the stage of pre-clinical studies. The object of the study was an experimental sample of a new leukocyte protein-peptide complex (LPPK) obtained by ultrasonic treatment of human leukocytes *in vitro*. LPPK cytotoxicity was assessed on the cell line of pig embryonic kidney epithelial cells (SPEV) and *in vitro* MTT test on human tumor cell lines HCT 116 (colorectal carcinoma) and MS (melanoma). A proliferation index was used to assess the effect on the growth of cells of the leukocyte protein-peptide complex (LBPC). Experiments on the study of acute toxicity of LPPK were performed on white nonlinear mice, which were injected intraperitoneally. To assess the results used the method of determining the average lethal dose according to V. Prozorovsky. When studying cytotoxicity, it was found that the addition of an experimental sample of the leukocyte protein-peptide complex to the growth medium for culturing the SPEV cell line favorably affects cell growth. The proliferation index increased from the first to the fourth passage by 1.09 times, while in the control sample the increase in PI occurred by 1.03 times. A study of the cytotoxicity of LPPK showed that the sample did not exhibit a cytotoxic effect on tumor cells HCT 116 and MS, since the IC_{50} concentrations calculated for them in all cases were significantly lower than the reference drug Doxorubicin. The results of the assessment of acute toxicity in experimental animals showed that the test sample with intraperitoneal administration is low toxic according to the classification of GOST 12.1.007.-76 (LD_{50} 3500.0 mg / kg). The article demonstrates the results of determining the toxicological and cytotoxic characteristics of the protein-peptide complex obtained from human leukocytes. It was shown that the studied protein-peptide complex did not exhibit toxic effects on the studied cell lines, as well as laboratory animals (mice).

Key words: cytotoxicity, SPEV, leukocyte protein-peptide complex, acute toxicity, mice.

For citation: Grishina T.A., Volkov A.G., Volkova L.V. Cytotoxicity and toxicological characteristics of the new leukocytar polypeptide. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2020;23(5):54–58. <https://doi.org/10.29296/25877313-2020-05-08>

REFERENCES

1. Engalucheva G.N., Syubaev R.D., Vasil'ev R.D., Snegireva A.A., Verstakova O.L. Otsenka farmakologicheskoi bezopasnosti lekarstvennykh sredstv v doklinicheskikh issledovaniyakh. Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya. 2013; 1: 10–13.
2. Mironov A.N. Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. M.: Grif i K, 2012. S. 347–69.
3. Eropkin M.Yu., Eropkin E.M. Fermentativnye metody otsenki tsitotoksichnosti na modeli kletok cheloveka v kul'ture: dinamika laktatdegidratazy i glytationdegidratazy pod deistviem razlichnykh kontsentratsii DDS-Na. Toksilogicheskii vestnik. 1997; 5: 26–32.
4. Morita M., Naito Y., Yoshikawa T., Niki E. Plasma lipid oxidation induced by peroxyinitrite, hypochlorite, lipoxigenase and peroxy radicals and its inhibition by antioxidants as assessed by diphenyl-1-pyrenylphosphine. Redox Biology. 2016; 8: 127–135.
5. Romanova M.A., Dodonova A.Sh. Izuchenie tsitotoksichnosti biologicheskii aktivnykh soedinenii v kul'ture kletok. Molodoi uchenyi. 2016; 18: 110–114.
6. Volkova L.V., Grishina T.A., Volkov A.G. Fraktsionnyi sostav leikotsintarnogo lizata i ego biologicheskie svoistva. Sovremennye problem nauki i obrazovaniya. 2019; 1. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=28527>.
7. Bernas T., Dobrucki J. Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes. Cytometry. 2002; 47(4): 236–242.
8. Bol'shakov O.P., Nrznanov N.G., Babakhyan R.V. Didakticheskie i eticheskie aspekty provedeniya issledovaniy na biomodelyakh i na laboratornykh zhivotnykh. Kachestvennaya klinicheskaya praktika. 2002; 1: 58–61.
9. Prozorovskii V.B., Prozorovskaya M.N., Demchenko V.M. Ekspres-metod opredeleniya srednei effektivnoi dozy i ee oshibki. Farmakologiya i toksikologiya. 1978; 4: 497–502.
10. Freshni R.Ya. Kul'tura zhivykh kletok. M.: Laboratoriya znaniy, 2018. S. 145–157.