

## ПОКАЗАТЕЛИ КЛЕТОЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА *IN VITRO* В ИССЛЕДОВАНИИ АНТИВИРУСНЫХ И АНТИМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ И СКРИНИНГЕ ЦИТОПРОТЕКТОРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Еропкин М.Ю., Еропкина Е.М., Смирнова Т.Д., Литвинова О.М., Киселев О.И.

ГУ НИИ гриппа РАМН, С.Петербург  
e-mail: [eropkin@influenza.spb.ru](mailto:eropkin@influenza.spb.ru)

**Резюме.** Модели *in vitro* с использованием культур клеток и биохимических показателей на клеточном уровне находят в последнее время все более широкое применение в различных областях биомедицинских исследований и получают постепенное признание регулирующих организаций в качестве замены тестов на животных. В то же время, их применение в исследовании противовирусных препаратов все еще недостаточно. Предлагаемая статья демонстрирует возможности такого подхода для количественной оценки цитотоксичности некоторых противовирусных и антисептических препаратов на примере ремантадина, полирема, экстракта из хвои пихты и аналогов полигескаметиленгуанидина (ПГМГ), их противовирусного эффекта на модели гриппозной инфекции *in vitro*, а также подбор цитопротекторных соединений, направленных на снижение токсического эффекта фармакологических препаратов и цитопатогенного действия вирусов гриппа. В перспективе подобные исследования должны привести к созданию оптимальных моделей *in vitro*, наиболее адекватно отражающих ситуацию *in vivo* и установлению особенностей соотношения между структурой и активностью исследуемых препаратов.

**Ключевые слова:** *ремантадин, полирем, полигескаметиленгуанидины, цитотоксичность, цитопротекторные препараты, антиоксиданты, антигипоксанты.*

**Использованные сокращения:** МТТ – растворимый аналог красителя нитросинего тетразолия (диметилтиазолил-, дифенилбромид тетразолия); IC50 – средняя ингибиторная концентрация – концентрация препарата, которая подавляет на 50 % данную клеточную функцию; МТД – минимальная токсическая доза; ПГМГ – полигескаметиленгуанидин, СОД – супероксиддисмутаза; ПОЛ – перекисное окисление липидов

### 1. Сравнительное исследование токсичности противовирусных препаратов на культурах клеток

Любое новое химическое соединение независимо от предполагаемых целей его применения должно быть охарактеризовано с точки зрения его возможной токсичности и биологической активности. Тем более это касается потенциальных лекарственных препаратов, тестирование которых в доклинических испытаниях должно обеспечить получение достоверной токсикологической оценки.

Сейчас уже становится очевидным, что проводить все виды токсикологических тестирований на животных не оправдано в силу самых разных и достаточно важных причин. В список ограничений использования лабораторных животных для предварительной оценки потенциальных лекарственных препаратов входят этические проблемы, но не менее важными являются экономические и временные затраты, которые значительно удорожают и удлиняют исследования. Между тем, к настоящему моменту имеется достаточное количество хорошо стандартизированных методов, в

частности, с использованием культур клеток разной органной природы, позволяющих получать адекватную информацию для оценки влияния ксенобиотиков на метаболизм клеток [13, 21, 48].

Не менее важны исследования *in vitro* и для понимания механизмов действия противоопухолевых препаратов, цитотоксический и/или цитостатический эффект которых является их основным фармакологическим эффектом. Исследования соотношений структура-цитотоксичность в рядах аналогов соединений могут дать более детальные представления о механизмах их действия на молекулярном и клеточном уровнях [48].

Химические вещества на клеточном уровне оказывают токсическое действие трех типов. Первым можно назвать общую (фундаментальную или базовую) токсичность, приводящую к нарушению основных жизненно важных функций клетки, результатом которой является повреждение целостности биологических мембран и цитоскелета, нарушение синтеза или освобождения важнейших молекул, а также изменения ионного гомеостаза, энергетического статуса клеток и клеточного деления. Поскольку указанные нарушения жизненно важны для любой клетки, то понятно, что к общей токсичности чувствительны все клетки вне зависимости от их тканевого происхождения и специализации в многоклеточном организме.

Избирательная токсичность повреждает определенные типы дифференцированных клеток, которые оказываются более чувствительны к данному токсиканту, чем остальные клетки в результате, например, специфического связывания или захвата ими данного вещества. Возможно также усиление токсичности и в процессе биотрансформации ксенобиотика внутриклеточными ферментативными системами, например, в гепатоцитах.

Специфическая токсичность наблюдается в том случае, когда токсикант воздействует на структуры или процессы, не являющиеся жизненно необходимыми для самой клетки-мишени, но критическими для организма в целом. Например, ксенобиотик может тем или иным способом воздействовать на межклеточные коммуникации, влияя на синтез, освобождение, связывание или деградацию цитокинов, гормонов, нейротрансмиттеров. К настоящему времени созданы и совершенствуются различные модельные системы для изучения всех типов токсичности на клеточном уровне [21, 25].

В настоящей работе исследовалась, в основном, базовая токсичность, которая в большей степени соответствует острой токсичности на уровне макроорганизма. Маркеров для оценки степени повреждения клеток в культуре разработано уже немало, но, очевидно, что нарушение даже одной из клеточных функций неминуемо влечет за собой через определенное время отрицательное воздействие на общую жизнеспособность монослоя. Это существенно облегчает задачу исследователей, поскольку предполагает, по крайней мере, на первом, оценочном этапе токсикологического исследования *in vitro* использование ограниченного набора клеточных культур (чаще всего стандартных, широко распространенных линий) и немногих простых показателей жизнеспособности клеток [21, 25].

Тем не менее, комплексный подход, состоящий из «батареи» тестов с использованием нескольких индикаторов токсичности на клеточном уровне, набора культур и разных сроков токсического воздействия представляется более оправданным на этапе, когда требуется исследование механизма действия на клетки-мишени конкретного препарата, а также более точное определение показателя IC50 [19, 48].

Все отмеченное выше в полной мере относится к противовирусным препаратам и их испытаниям на различных моделях вирусных инфекций, в частности, острой и хронической гриппозной инфекции с использованием культур клеток. Известно, что острая вирусная инфекция связана с модификацией активности целого ряда важнейших внутриклеточных ферментов [2, 44]. В то же время, цитопатогенное действие вирусов

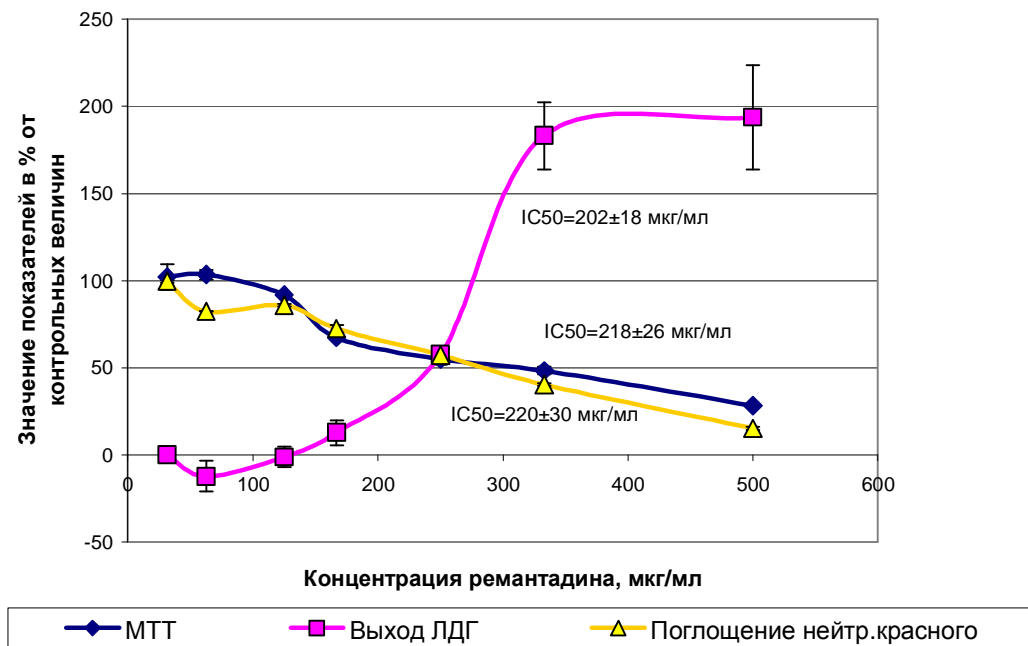
на культуры клеток и эффект противовирусных препаратов чаще всего оценивают только по морфологическим критериям и наличию продукции вирусных частиц [4].

Для оценки влияния противовирусных препаратов ремантадина и полирема на метаболизм клеток млекопитающих использовали две культуры: А-549 и MDCK. Выбор данных линий обусловлен тем, что клетки легочного происхождения А-549 отличаются высокой чувствительностью к качеству компонентов питательной среды и обычно используются для тестирования ее ростовых свойств и токсичности [16]. Перевиваемая клеточная линия MDCK известна высокой чувствительностью к репродукции вирусов гриппа А и В и рекомендована ВОЗ для изоляции вирусов в эпидемиологический сезон, а также для последующего изучения их биологических свойств.

Изменения метаболического состояния клеток оценивали по следующим показателям: 1) активности в среде инкубации цитозольного фермента лактатдегидрогеназы, который может быть использован как маркер нарушения целостности клеточной мембраны [33, 38]; 2) снижению суммарной активности митохондриальных дегидрогеназ в микротетразолиевом тесте (МТТ – фотометрический метод) [39] или в тесте восстановления красителя резазурина (флуориметрический метод) [23], отражающих ингибирование интенсивности клеточного дыхания; 3) уменьшению эндоцитоза витального красителя нейтрального красного, коррелирующему с лизосомальной функцией [20].

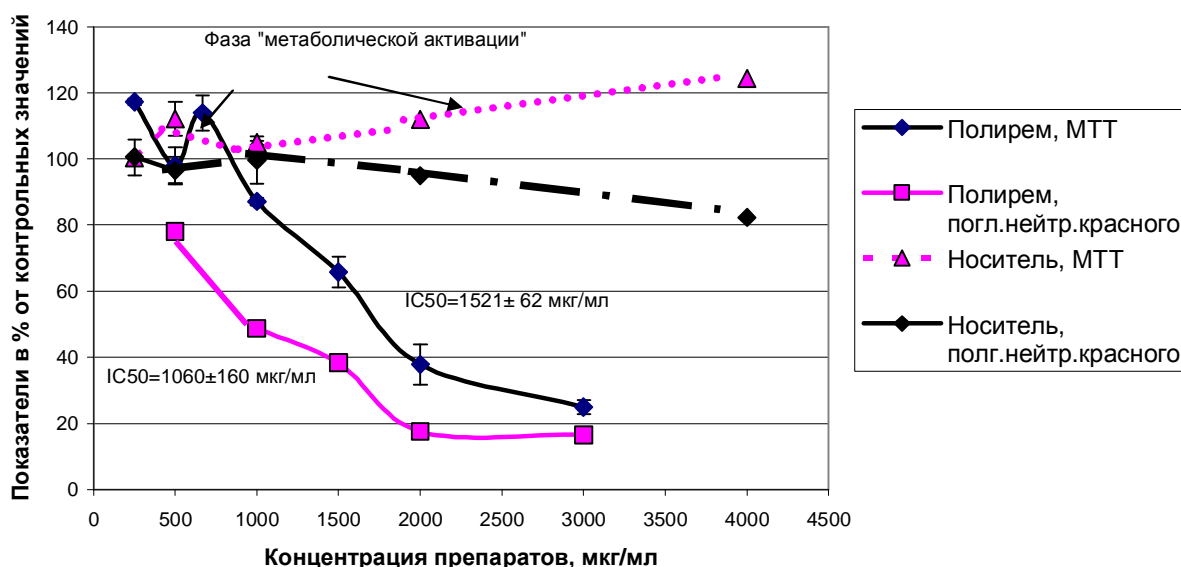
Результаты тестирования показали, что оба препарата обладали выраженным токсическим действием и вызывали время- и дозозависимый ответ клеток в культуре. Выбор длительности экспозиции клеток с ксенобиотиками в значительной степени определялся задачами тестирования. Так, при короткой 2<sup>-х</sup> часовой инкубации клеток А-549 с ремантадином в диапазоне концентраций от 10 до 500 мкг/мл показано, что концентрация препарата IC<sub>50</sub>, ингибирующая на 50% клеточные функции, которые мы использовали как маркерные в нашем токсикологическом исследовании, составляет приблизительно 200 мкг/мл (Рис. 1).

Рис. 1. Цитотоксический эффект ремантадина на культурах клеток А-549 при 2-х часовой инкубации.



Поскольку полученные в данных условиях IC50 для трех показателей хорошо совпадают с оценкой LD50 ремантадина, равной 160-220 мкг/мл (мышь, внутрибрюшинно), то клеточная модель с указанными параметрами может использоваться как предсказательная для оценки токсичности в отношении целого организма. Подтверждением этому может служить также хорошая корреляция между полученной нами *in vitro* при короткой экспозиции токсикологической оценкой препарата полирема с результатами тестирования на лабораторных животных. LD50 при внутрибрюшинном введении у мышей составила 1130-1300 мкг/мл, тогда как IC50 в тесте МТТ соответствовала  $1521 \pm 62$  мкг/мл, а по поглощению красителя нейтрального красного  $1060 \pm 160$  мкг/мл (Рис. 2).

**Рис.2. Цитотоксический эффект полирема и его полимерного носителя (сополимера винилового спирта и N-виниламидоантарной к-ты) на культурах клеток А-549**



Между тем, следует обратить внимание, что уже при короткой инкубации клеток с полиремом по сравнению с ремантадином разные клеточные функции и/или органеллы проявляли большую или меньшую чувствительность к действию препарата. Так, эндоцитозная активность оказалась ингибированной наполовину под действием дозы полирема в 1,5 раза ниже, чем IC50 в отношении клеточного дыхания. Для ремантадина сходный характер влияния на исследованные показатели метаболического состояния клеток проявлялся только при длительной, 24-48-часовой экспозиции, когда эндоцитозная активность также оказалась более чувствительной к действию препарата (Рис. 3). Помимо этого, при удлинении времени инкубации монослоя с ксенобиотиком пропорционально усиливались метаболические нарушения и IC50 к концу вторых суток падали до  $58,8 \pm 6,2$  и  $82,7 \pm 2,8$  мкг/мл в тестах с нейтральным красным и МТТ соответственно. При увеличении срока инкубации до 72 час дальнейшего падения IC50 не наблюдалось (рис. 4). IC50, полученная в результате регрессионного анализа данных по флуориметрическому определению восстановления красителя резазурина во флуоресцирующий продукт резаруфин, составила  $61,0 \pm 6,4$  мкг/мл. В этом случае отмечен также всплеск метаболической активности клеток при минимальных эффективных концентрациях препарата (рис.4), что является, с нашей точки зрения,

Рис.3. Цитотоксический эффект ремантадина на культурах клеток А-549 при 48 час. инкубации

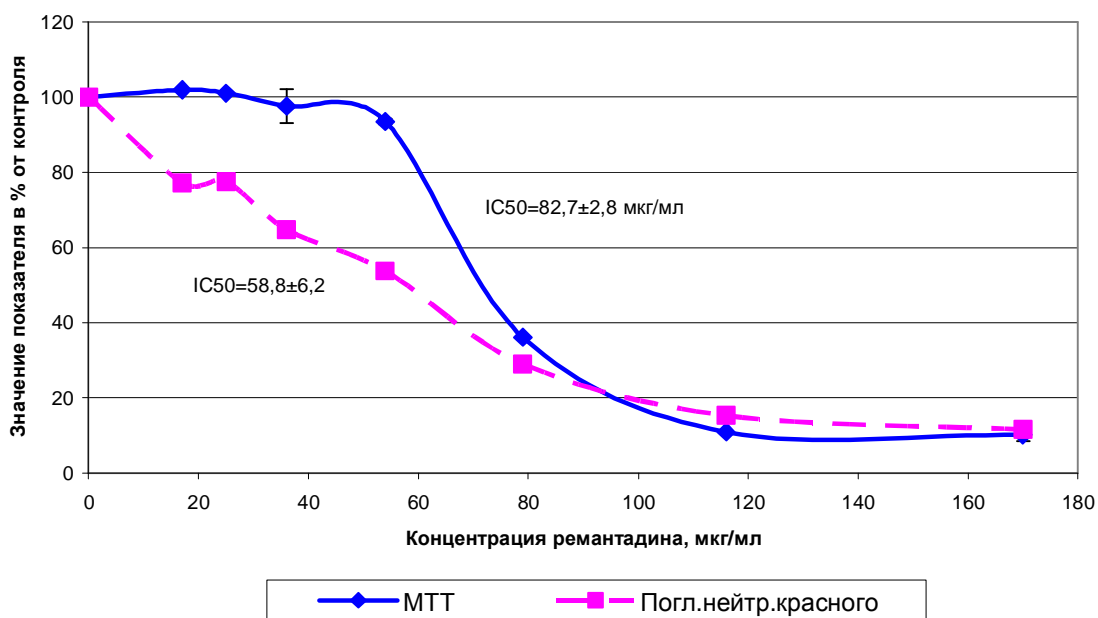
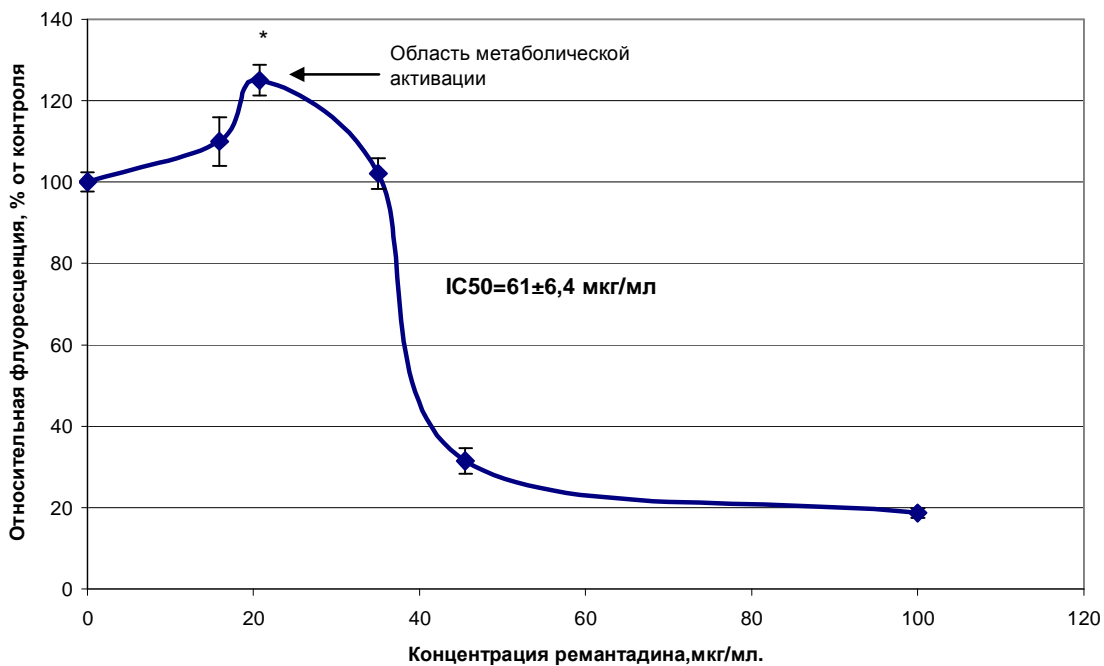


Рис. 4. Флуориметрическое определение цитотоксичности ремантадина по восстановлению резазурина. Клетки MDCK. Инкубация с препаратом 3 сут.



отражением общности механизмов стресса на клеточном уровне вне зависимости от вызвавшего его повреждающего воздействия, и было неоднократно продемонстрировано

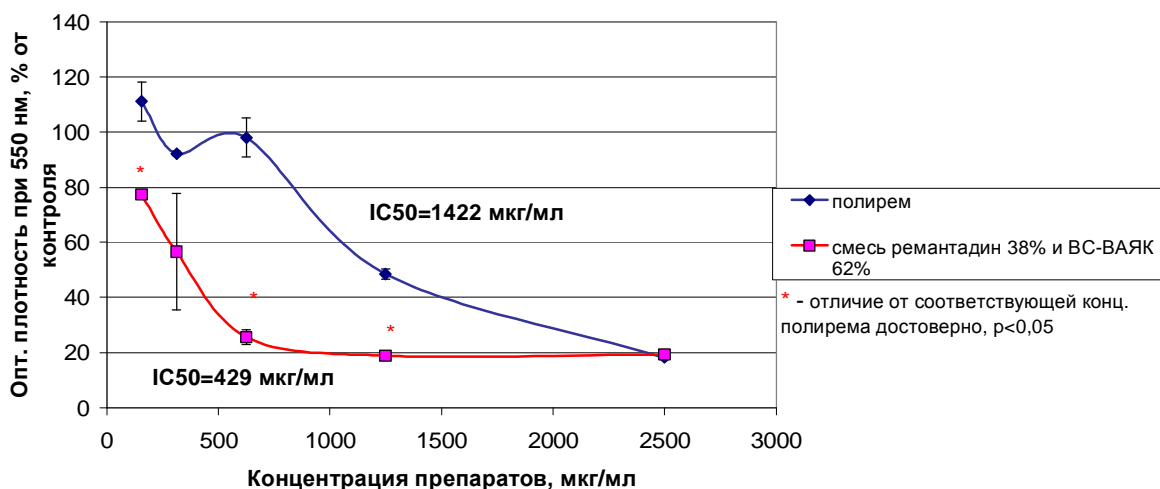
нами при действии на клетки в культуре разнообразных химических агентов [3-5]. Фаза «метаболической активации» как пограничными токсичными концентрациями препаратов, так и минимальными инфекционными титрами вирусов может при этом быть интерпретирована как активационная стадия стресса по Селье [14].

Сравнительный токсикологический анализ ремантадина и его высокомолекулярного аналога полирема показал, что полирем с учетом содержания в нем 38 масс% ремантадина обладал менее выраженным неблагоприятным действием, сниженным почти в два раза по сравнению с ремантадином.

В ходе тестирования *in vitro* особенностей действия полирема представлялось интересным оценить не только действие самого препарата на клетки, но и его носителя – сополимера винилового спирта и N-виниламидоэтантарной кислоты (ВС-ВАЯК). На **Рис.2** представлены результаты данного анализа. Как следует из полученных нами данных, полимерный носитель в широком диапазоне концентраций от 250 до 3750 мкг/мл собственной токсичностью не обладал, в связи с чем IC50 в модели не могло быть получено. Более того, в отношении интенсивности клеточного дыхания сополимер обладал некоторым стимулирующим эффектом (**Рис. 2**). Это влияние в большей степени отмечено под действием высоких концентраций препарата. Но следует обратить внимание и на незначительную активацию клеточного дыхания в присутствии сополимера в низкой дозе 500 мкг/мл. Сходное действие, стимулировавшее активность митохондриальных дегидрогеназ, оказывал и сам полирем в близкой концентрации.

Тестирование полирема в сравнении со смесью, в которой сополимер ВС-ВАЯК и ремантадин находились в массовых отношениях, эквимолярных их содержанию в полиреме, показало, что токсичность смеси оставалась в 3,3 раза выше, чем у полирема и соответствовала таковой мономерного ремантадина (**Рис. 5**).

**Рис.5. Цитотоксический эффект полирема и эквимолярной смеси ремантадина с полимерным носителем (ВС-ВАЯК) на культурах клеток А-549. Показатель токсичности - МТТ.**



Grant et al. [28] в фундаментальной 15-ти томной монографии Comprehensive Toxicology выделяют следующие основные механизмы токсичности на клеточном уровне:

1. Повреждение клеточной мембраны

2. Изменение энергетического метаболизма клеток (истощение макроэргов, диссипация мембранного потенциала митохондрий)
3. Расстройство системы регуляции гомеостаза ионов кальция
4. Прочное связывание с жизненно важными клеточными макромолекулами
5. Токсичность, вызванная биотрансформацией ксенобиотиков
6. Механизмы, опосредованные взаимодействием данных веществ с рецепторами

Полученные нами результаты показали, что оценка нескольких показателей состояния клеточного метаболизма позволяет использовать данную модель *in vitro* для токсикологического анализа, а также изучения механизмов действия ксенобиотиков на клетки-мишени. Примененный подход является особенно оправданным в случае сравнительной оценки влияния близких по определенным параметрам лекарственных соединений, как, например, низкомолекулярного противовирусного препарата ремантадина и его полимерного производного полирема. В тест-системе с использованием клеток млекопитающих в культуре продемонстрированы как общие, так и индивидуальные особенности их влияния на состояние клеточного метаболизма.

Сравнительная оценка ремантадина и полирема в нашей тест-системе показала существенно меньшую токсичность полимерного препарата. Ранее отмечалось, что дополнительный позитивный эффект препарата связан со стимулирующим иммунный ответ и продукцию интерферона действием входящего в него сополимера ВС-ВАЯК [9]. В наших исследованиях носитель оказывал собственное умеренно стимулирующее влияние на суммарную активность митохондриальных дегидрогеназ. Однако протестированный в смеси с ремантадином в соотношении, эквимолярном его содержанию в полиреме, сополимер не оказал на клетки защитного эффекта, и токсичность смеси не отличалась от таковой чистого ремантадина. Очевидно, что только химическое связывание компонентов и образование конъюгата обеспечивает снижение цитотоксичности. Выявленное небольшое, но статистически достоверное усиление клеточного дыхания в присутствии низких доз не только носителя, но и самого препарата отражает метаболическую активацию на начальных стадиях стресса, вызванного ксенобиотиками [5]. В этой связи дозу приблизительно в 500 мкг/мл полирема и сополимера ВС-ВАЯК можно определить как минимальную действующую концентрацию препаратов.

При короткой двухчасовой экспозиции клеток с ремантадином 50%-ное ингибирование всех исследованных показателей отмечено в присутствии примерно одинаковой концентрации препарата – 200 мкг/мл. В случае полирема наиболее чувствительной структурой оказалась клеточная мембрана и IC<sub>50</sub>, ингибирующая эндоцитоз красителя нейтрального красного, была в 1,5 раза ниже, чем концентрация препарата, вызывавшая 50%-ное подавление клеточного дыхания. Возможной причиной этого является большая мембранотропность полимерного препарата, приводящая в более сжатые сроки к дестабилизации мембран, за счет наличия в молекуле полианионного носителя – сополимера ВС-ВАЯК. В этой связи становится понятным снижение эндоцитозной активности как энергозависимого процесса в условиях нарушения физиологического состояния клеточных мембран и угнетения интенсивности дыхания. Сходная закономерность токсического ответа отмечалась при увеличении срока инкубации клеточного монослоя с ремантадином до 24-48 часов. Дозозависимое подавление ремантадином интенсивности клеточного дыхания, регистрируемое по снижению суммарной активности митохондриальных дегидрогеназ, сопровождалось выраженными нарушениями в ультраструктуре этих органелл. Как известно, митохондрии являются одними из наиболее пластичных компонентов клетки и легко

поддаются адаптивным перестройкам, а количество и степень их развития определяются функциональной активностью клетки.

Варьирование длительности экспозиции клеток с тестируемыми препаратами позволило подобрать условия не только наиболее адекватные для предсказания LD50 *in vivo*, но и для интерпретации возможного механизма цитотоксичности. Так, результаты двухсуточной инкубации с лекарственными препаратами в большей степени характеризуют последовательные стадии и механизм нарушений клеточного метаболизма, а также демонстрируют наличие наиболее чувствительных к воздействию структур — клеточных мембран, требующих защитных мер в присутствии данных соединений. В ходе короткого двухчасового тестирования в присутствии более высоких концентраций препаратов определены токсические дозы, приводящие к 50%-ному подавлению основных клеточных функций, которые в пересчете хорошо совпадают с показателями LD50, полученными на экспериментальных животных. Иными словами, клеточную тест-систему с определенными параметрами можно использовать в скрининговых исследованиях предполагаемых лекарственных препаратов как предсказательную в отношении LD50 для целого организма.

Наша дальнейшая работа состояла в исследовании возможности использования метаболических показателей *in vitro* для выявления цитопатического действия вирусов и оценки на этом фоне эффекта противовирусных препаратов.

## 2. Оценка степени цитопатогенного действия вирусов гриппа и эффекта противовирусных препаратов на культурах клеток с использованием метаболических показателей

Культуру MDCK заражали вирусом гриппа А/Сидней/5/97 (H3N2) или А/Новосибирск/4/04 (H3N2) по стандартной методике и инкубировали 1-3 суток, после чего отбирали аликвоты среды инкубации для определения активности ЛДГ, а клеточный монослой использовали в тесте восстановления клетками МТТ или определяли в нем общее содержание белка по Лоури.

Одновременно с указанными тестами наличие вируса в среде инкубации клеток контролировали по реакции гемагглютинации с 1 %-ной суспензией куриных эритроцитов. В среду инкубации части образцов одновременно с вирусом вводили ремантадин в концентрациях 10 и 30 мкг/мл или хвойно-хлорофилло-каротиновый препарат (экстракт из хвои пихты, полученный лиофилизацией 10 %-ной суспензии препарата), противовирусная активность которого была установлена ранее [4]. Результаты по хвойному экстракту представлены в **табл.1.**, а по ремантадину – в **табл.2.**

Полученные данные показывают, что цитопатогенное действие вирусов хорошо выявляется с помощью использованных показателей, таких как общая активность митохондриальных дыхательных ферментов (МТТ), состояние плазмалеммы (утечка из клеток цитоплазматической ЛДГ), скорость размножения клеток (общая концентрация клеточного белка). При этом как растительный препарат, так и ремантадин снижают проявления цитопатической реакции клеток на действие вируса. При определенных концентрациях также отмечена «метаболическая активация» клеток в культуре.

Изменения молекулярной конфигурации мембран в результате внедрения и репродукции вирусов неизбежно должны сказываться на их проницаемости для таких маркеров целостности плазматической мембраны, как ЛДГ [44]. В то же время, по мнению Д.Б.Голубева [2], модификация активности гликолитических ферментов в инфицированных клетках не всегда коррелирует со степенью цитопатической реакции и не может полностью объясняться только выходом ферментов во внеклеточную среду.



Как ремантадин, так и полирем обладают специфической в отношении вируса гриппа А противовирусной активностью [8, 9]. Они эффективно взаимодействуют с мембранами инфицированных клеток, в частности, с отрицательно заряженными фосфолипидами.

Таблица 1. Выявление цитопатогенного действия вирусов гриппа и эффекта препарата из хвои пихты с помощью ферментативных маркеров

Состав проб	Критерий оценки	
	ЛДГ в среде инкубации, нмоль NADH/мл•мин	МТТ, % от контроля
контроль	5,7 ± 1,14	100,0 ± 6,8
Препарат, мкг/мл		
50	6,1 ± 0,73	<u>113,0 ± 4,0</u>
100	5,6 ± 1,91	<u>120,8 ± 4,8</u>
Вирус, log разведения		
-2	35,9 ± 2,14 *	28,4 ± 3,1 *
-4	20,1 ± 2,34 *	50,7 ± 7,1 <sup>+</sup>
Препарат, 50 мкг/мл + вирус -2	29,7 ± 1,79 *	30,3 ± 1,8 *
Препарат, 50 мкг/мл + вирус -4	22,4 ± 2,28 *	60,1 ± 4,0 <sup>+</sup>
Препарат, 100 мкг/мл + вирус -2	21,4 ± 2,78 * #	56,9 ± 3,4 <sup>+</sup> #
Препарат, 100 мкг/мл + вирус -4	12,2 ± 0,21 * ##	65,6 ± 1,5 <sup>+</sup>

<sup>+</sup> - достоверное отличие от контроля (P<0,05); \* - достоверное отличие от контроля (P<0,01); # - достоверное отличие от образца с вирусом в разведении -2 log (P<0,05); ## - достоверное отличие от образца с вирусом в разведении -4 log (P<0,05). Подчеркнуты случаи «метаболической активации» препаратом

Таблица 2. Выявление защитного эффекта ремантадина на культурах клеток с помощью биохимических критериев

Состав проб	Критерий оценки	
	Содержание белка (мкг/лунку)	МТТ (% от контроля)
контроль	41,1±3,8	100±4,6
Ремантадин-1	38,2±1,4	98,6±0,82
Ремантадин-2	<u>44,5±2,5</u>	95,1±7,18
Вирус (0,5x10 <sup>-1</sup> )	22,7±3,6*	25,2±5,4*
Ремантадин-1 + вирус	48,8±3,0#	54,4±5,9*#
Ремантадин-2 + вирус	42,4±4,1#	40,6±1,88*#

Ремантадин-1 – 30 мкг/мл; ремантадин-2 – 10 мкг/мл. Остальные обозначения – как в табл.1.

Гидрофобное ядро адамантана интеркалирует внутрь мембраны между остатками жирных кислот, где соединение практически полностью блокирует функцию вирусного белка М2, выполняющего роль протонной помпы. Тем самым достигается подавление инфекционной активности вируса на этапах его рецептор-зависимого эндоцитоза, декапсидации в фаголизосоме, а также самосборки вирусных частиц и почкования [8]. Полирему помимо специфической в отношении вируса гриппа А активности также свойственен неспецифический характер защиты клеток, обусловленный его способностью блокировать сорбцию различных вирусов [9]. В этой связи препарат обладает более широким в этиологическом отношении эффектом, что показано не только на гриппозной, но и герпетической, цитомегалловirusной и папилломавирусной инфекциях в клинике. Немаловажным фактором является и пролонгированный эффект полимера, способствующий длительной циркуляции противовирусного компонента в эффективных терапевтических дозах.

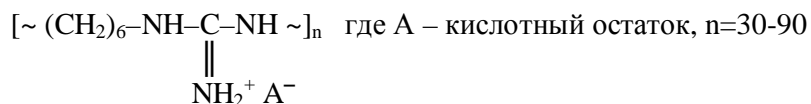
Таким образом, известный механизм противовирусного действия ремантадина и полирема, одним из определяющих моментов которого является влияние на клеточные мембраны, обусловил выбор критериев для оценки цитотоксического действия данных препаратов. Увеличение проницаемости плазматической мембраны, приводящее к деструктивным изменениям, является, вероятно, универсальным механизмом цитотоксичности, характерным для действия не только химических соединений, вирусов и бактерий, но и для литического действия комплемента [40], цитотоксических Т-лимфоцитов [41] и естественных киллеров [31]. Так, цитотоксические Т-лимфоциты, цитоскелет которых поляризуется и концентрируется в направлении точки контакта с клеткой-мишенью, выделяют в зону контакта специальные белки – перфорины, которые полимеризуются в плазматической мембране клетки-мишени и формируют трансмембранные каналы, приводящие к повышению проницаемости цитолеммы и гибели клетки. Перфорины, депонирующиеся в секреторных везикулах, являются гомологичными компоненту С9 комплемента [36, 49].

Следует отметить, что обычно цитопатогенное действие вирусов на культуры клеток и эффект антивирусных препаратов оценивают только по морфологическим критериям и наличию продукции вирусных частиц. Например, хвойно-хлорофиллокаротиновый препарат в концентрациях 50-200 мкг/мл оценивался по морфологическим критериям как нетоксичный [4]. Отсюда можно сделать заключение о том, что разработанная нами модель тестирования *in vitro* с использованием метаболических критериев оказалась более чувствительной, чем морфологические методы, и может быть использована в оценке степени цитопатогенного действия вирусов и эффекта противовирусных препаратов.

3. Исследование соотношения структура-токсичность на примере аналогов полигексаметиленгуанидина. Универсальность токсического ответа на действие ксенобиотиков.

Влияние особенностей химической структуры препарата на его цитотоксичность исследовано нами на примере двух катионных антисептиков близкого строения на основе полигексаметиленгуанидина (ПГМГ): ПГМГ-хлорида и ПГМГ-фосфата.

Структура ПГМГ:



Гуанидиновые соединения широко распространены в природе и находят применение в качестве физиологически активных веществ. Гуанидиновая группировка служит активным началом многих лекарственных препаратов (сульгин, исмелин, фарингосепт) и антибиотиков (стрептомицин, бластицидин, мильдомицин). Благодаря полимерной природе, ПГМГ по своей активности превосходит такой широко известный гуанидиновый антисептик как хлоргексидин и менее токсичен по сравнению с другими биоцидными препаратами [7, 17, 45]. Кроме биоцидного эффекта отмечено также противоопухолевое действие ПГМГ и модуляция иммунного ответа [1].

Выбор условий тестирования данных соединений на метаболизм клеток в культуре определялся нами прежде всего предполагаемым наружным способом применения препаратов в качестве антисептиков и дезинфектантов. Это значит, что их действие целесообразно исследовать после короткой 5-минутной экспозиции с клетками. Короткая экспозиция обычно применяется при тестировании кожно-раздражающего эффекта препаратов [18]. Кроме оценки нарушений клеточного метаболизма непосредственно после воздействия препаратов мы также регистрировали отсроченный эффект на соответствующие параметры через 1 сутки. (Табл.3).

Таблица 3. Характеристика токсического эффекта на культурах клеток полигексаметиленгуанидин-хлорида (ПГМГХ) и полигексаметиленгуанидин-фосфата (ПГМГФ) при разных схемах их воздействия в сравнении с LD50 на грызунах. Среднее значение по восстановлению МТТ и освобождению нейтрального красного.

2 час инкубация в бессывороточной среде	IC50 <i>in vitro</i> , мг/л		LD50, мг/кг
	Импульсная 5 мин инкубация	Тест на отсроченный эффект препарата*	
ПГМГХ			
24±9	580±60	18±7	700-900
ПГМГФ			
700±16	2770±40	1650±108	2700-2900

\* Клетки инкубировали с препаратом 5 мин, тщательно промывали и дополнительно культивировали 24 час в ростовой среде, после чего определяли исследуемые показатели

Из приведенного примера видно, что для обоих антисептиков IC50 при 5-мин экспозиции с препаратами оказался близким к LD50, полученным на грызунах. Если же сравнивать препараты между собой, то подтверждается меньшая токсичность ПГМГФ по сравнению с ПГМГХ, отмеченная ранее *in vivo* [7]. Данная модель может быть также использована для определения периода времени, необходимого для полного восстановления тестируемой клеточной функции (“recovery test”): в данном случае можно констатировать, что через сутки после импульсной экспозиции не только не произошло восстановления по исследуемым показателям, но состояние клеток даже несколько ухудшилось. Вероятно, определение периода полного восстановления корректнее проводить при экспозициях с меньшими концентрациями ксенобиотиков, которые соответствуют минимальным эффективным дозам, а не близким к IC50. Но для скрининга и сравнительной оценки токсичности среди нескольких препаратов близкой структуры этот тест является хорошо воспроизводимым и информативным.

Многие положительно заряженные полимеры: катионные полимерные антисептики, природные катионные белки – протамины из спермы лососевых рыб, дефенсины из азурофильных гранул нейтрофилов имеют сходный механизм антимикробного и цитотоксического действия [10, 17, 35, 37, 38]. Его основными чертами являются:

1) Положительный заряд этих молекул определяет их высокое сродство к отрицательно заряженным компонентам клеточной оболочки бактерий (тейхоевым кислотам, липополисахаридам, кислым фосфолипидам). Благодаря электростатическому взаимодействию происходит адсорбция катионных полимеров на поверхности клеток. В пользу ведущей роли электростатических сил на первом этапе этого процесса свидетельствуют данные об ослаблении антимикробного действия этих агентов в присутствии полианионов или повышении ионной силы среды.

2) Гидрофобная часть этих молекул обуславливает возможность их внедрения в липофильную фазу бислоя мембран. За счет гидрофобных взаимодействий с углеводородными «хвостами» жирных кислот осуществляется их встраивание в мембраны.

3) Как было показано в экспериментах с использованием дыхательных ядов (напр., цианида), состояние обмена веществ микробной клетки заметно сказывается на ее чувствительности к действию поликатионов. Активно метаболизирующие бактерии являются лучшей мишенью их поражающего действия, чем клетки в стационарной фазе или в условиях анаэробнозиса. Это свидетельствует о значении трансмембранного потенциала клеток-мишеней в реализации антимикробного действия поликатионов. По-видимому, в процессе пенетрации полипептидов через мембраны важную роль играют ориентация электрического поля плазмалеммы и величина ее мембранного потенциала. Благодаря тому, что внутренняя поверхность мембран по отношению к внешней заряжена отрицательно, возможен перенос катионных соединений через мембрану внутрь микробной клетки по механизму электрофореза. Именно это повышает эффективность антимикробного действия поликатионов.

4) Процесс внедрения и прохождения поликатионов через мембрану сопровождается нарушением ее структурной целостности с образованием пор, что имеет следствием изменение осмотического барьера бактериальных клеток, «вытекание» из них жизненно важных компонентов (ионов  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ , фосфоросодержащих соединений, аминокислот, нуклеотидов, коферментов), диссипацию мембранного потенциала.

5) Дезорганизация при этом мультиферментных комплексов, встроенных в мембрану, приводит к подавлению дыхания, окислительного фосфорилирования, репликации, транскрипции и синтеза белков, т.е. ключевых метаболических процессов клеток-мишеней. В условиях нарушения структурной целостности мембран вода имеет тенденцию накапливаться в клетках, что вызывает набухание и может приводить к разрыву клеток.

Результатом всех этих структурно-метаболических изменений, происходящих под действием поликатионов, является гибель микроорганизмов или других эффекторных клеток.

Одним из факторов, определяющих преимущественное воздействие поликатионов на микробные, а не на эукариотические клетки, является липидный состав плазмалеммы бактерий. В частности, в ее составе находится большое количество кислых фосфолипидов (фосфатидилглицерола и кардиолипина), которые практически отсутствуют в плазмалемме эукариотических клеток. Эти фосфолипиды не только маркируют поверхность мембраны бактерий, но и «притягивают» к ней поликатионы за счет более сильных электростатических взаимодействий с отрицательно заряженными фосфатными группами фосфолипидов. Таким образом реализуется относительная селективность воздействия поликатионов на микроорганизмы [10].

Подводя итоги биохимико-токсикологическому анализу препаратов *in vitro*, приведем сравнительные данные, полученные нами на культурах клеток и токсикологическую характеристику данных препаратов на целом организме (табл. 4).

Таблица 4. Сравнительная токсичность некоторых препаратов на культурах клеток и на уровне целого организма

Название препарата	IC50, мг/л на культурах клеток [собственные данные авторов – средние значения по нескольким показателям и срокам экспозиции]	LD50, мг/кг, минимальное значение – при в/бр или в/в введении или МТД [Ekwall et al., 1998; Halle, 2003, <a href="http://toxnet.nlm.nih.gov">http://toxnet.nlm.nih.gov</a> ]
1. Диметилсульфоксид (препарат димексид)	2390	2120
2. Додecilсульфат Na	22	35
3. Катамин АВ (роккал, хлорид цетилпиридиния)	8	6
4. Катапол (катамин АВ на полимерном носителе)	20,5	11
5. Метилметакрилат мономер (жидкий компонент для приготовления костного цемента)	1450	5900
6. ПГМГФ	2770	2700
7. ПГМГХ	580	700
8. Полирем	1291	1200
9. Ремантадин	200	185
10. Рибавирин	244	200

Примечание: коэффициент корреляции  $r^2 = 0,66$  между IC50 (данные авторов) и LD50<sub>min</sub> или МТД.

Здесь следует отметить, что наиболее адекватно сравнивать IC50, полученные *in vitro*, со среднелетальной пиковой концентрацией препаратов в крови [25]. Поскольку такой показатель практически не встречается в литературе, мы выбрали для сравнения минимальные значения LD50 (обычно это значение LD50 при внутривенном или внутрибрюшинном введении), а для случаев, когда имеется только LD50 при внутривенном введении – минимальную токсическую дозу (МТД) или пороговую дозу общетоксического действия. При таком сравнении для каждого из испытанных нами препаратов обнаруживается вполне удовлетворительное соответствие токсикологических параметров *in vitro/in vivo* (табл. 4). При сравнении всей совокупности данных по тестируемым нами препаратам коэффициент корреляции ( $r^2$ ) между IC50 *in vitro* и LD50<sub>min</sub> или МТД *in vivo* составил 0,66 ( $p < 0,05$ ), что, учитывая очень небольшую выборку (10 препаратов), представляется достаточно удовлетворительным показателем соответствия данных. Если же из расчетов исключить соединение, для которого отмечено наибольшее расхождение IC50 и LD50 – метилметакрилат, то для остальных препаратов  $r^2$  возрастает до 0,996.

Следует отметить, что любое доклиническое тестирование токсичности лекарственных препаратов протекает в модельных системах, каковыми являются как

модели *in vivo* с использованием лабораторных животных, так и *in vitro* на базе культур клеток, и в обоих случаях интерпретация результатов в большей или меньшей степени носит характер вероятностной аппроксимации. Иллюстрацией того, что данные, полученные на экспериментальных животных, являются несколько не более точными, чем на культурах клеток, служит **табл. 5**.

Таблица 5. Вариабельность токсикологических параметров *in vivo* некоторых распространенных препаратов [Halle, 2003; <http://toxnet.nlm.nih.gov>].

№ п/п	Название препарата	Вид животного	Способ введения	LD50, мг/кг	Другие токсикологические параметры, мг/кг
1.	Ацетаминофен (парацетамол)	мышь	в/бр.	340-540	человек, в/ж, гепатотоксичность: 140-250
2.	Ацетилсалициловая кислота	мышь кролик крыса	в/желуд. в/бр. в/желуд. в/желуд.	1000 500 1800 2500	
3.	Хлорид цетилпиридиния (роккал)	мышь кролик	в/бр в/желуд. в/венно в/желуд.	10 108 36 400	
4.	Гексахлорофен	крыса, самец крыса, самка крыса	в/желуд. в/желуд. в/бр	6 56-87 22	
5.	Ацикловир	мышь	в/бр в/желуд.	450-1000 >10.000	
6.	Рибавирин	мышь крыса	в/бр в/желуд. в/бр в/желуд	0,9-1,3 2 2 5,2	Эмбриотоксичность: кролик - 1 бабуин - 120
7.	Ремантадин	мышь	в/бр в/желуд.	160-240 544-770	
8.	Димексид (диметилсульфоксид)	крыса	в/желуд.	535-19.690	
9.	Додецилсульфат натрия	мышь рыбы (разл. виды)	в/желуд.	1280	LC50, конц. в воде: 1,4-70 мг/л

Вариабельность данных, полученных в зависимости от способа введения препарата, вида животного, длительности экспозиции и других условий составляет десятки, а в отдельных случаях и сотни раз. В то же время, результаты международной межлабораторной программы MEIC по валидации так называемых альтернативных

методов тестирования токсичности продемонстрировали, что предсказание острых концентраций в крови у человека LC50 для 50-ти эталонных соединений по IC50, полученным в десяти тестах на клеточных линиях млекопитающих, точнее отражает токсичность этих препаратов (коэффициент детерминации  $R^2=0,74$ ), чем сравнение с LD50 для крыс и мышей тех же эталонных соединений ( $R^2=0,60-0,66$ ) [22].

Результаты наших исследований позволяют констатировать, что цитотоксическое действие ксенобиотиков различной химической природы носит стереотипный характер, который существенно не зависит от:

- 1) химической структуры препарата
- 2) выбранного биохимического показателя токсичности
- 3) использованной клеточной линии (в пределах класса млекопитающих).

Полученные нами данные полностью согласуются с гипотезой общей или базовой токсичности [21, 26], согласно которой большая часть соединений, независимо от их химической природы, повреждает одни и те же жизненно важные («базовые») функции, общие для всех клеток независимо от их специализации. Повреждение одного метаболического пути или одной субклеточной структуры неизбежно постепенно распространяется и на другие функции/структуры, поэтому использование различных биохимических показателей токсичности (“endpoints”) обычно приводит к сходным результатам. Обнаруженный при этом парадоксальный метаболический ответ – активация минимальными токсическими концентрациями исследуемых соединений ряда клеточных ферментов может быть интерпретирован как мобилизационная стадия стресса на клеточном уровне. Под давлением стресса любой природы на клетку активируются синтез стрессорных белков (белков теплового шока), системы детоксикации клеток и антиоксидантной защиты, что неизбежно приводит к общей активации метаболизма, регистрируемой по интенсивности гликолиза (ЛДГ) или активности митохондриальных дегидрогеназ (МТТ).

Выявление токсичности на клеточном уровне практически у всех испытанных нами препаратов ставит вопрос о защите клеток от токсического воздействия с помощью цитопротекторных препаратов, что явилось предметом нашей дальнейшей работы.

#### 4. Сравнительное исследование защитного действия антиоксидантов и/или антигипоксантов при моделировании токсического ответа *in vitro* и при цитопатогенном действии вирусов.

Цитопротекторные препараты чаще всего выполняют антиоксидантные и/или антигипоксические функции, поскольку окислительный стресс, сопровождающий токсическое действие большинства ксенобиотиков, провоцирует серьезное повышение уровня перекисного окисления липидов, белков и нуклеиновых кислот, нарушает физиологически адекватное состояние клеточных мембран и угнетает клеточное дыхание, и как следствие, выработку макроэргов. Что в данном сложном процессе является пусковым моментом, даже не столь важно, главное, что все звенья связаны воедино и расстройство одного из них не может не сказаться на остальных. Поэтому цитопротекторный препарат должен обладать способностью либо гасить свободнорадикальное окисление, либо поддерживать целостность митохондриальной дыхательной цепи. Очевидно, что еще эффективнее будут препараты, которые в силу своего строения способны принимать участие в обоих процессах одновременно. Результаты нашей более ранней работы показали, что далеко не все цитопротекторные фармакологические препараты, разрешенные к применению, проявляют защитное действие при употреблении с конкретными ксенобиотиками, а наиболее эффективные комбинации следует подбирать и оценивать в ходе самостоятельного исследования [6].

Фармакологические препараты, обладающие антиокислительной активностью, можно классифицировать в зависимости от их воздействия на определенное звено антиоксидантной системы организма (табл.6). В связи с этим можно отметить следующие разрешенные к применению и выпускающиеся лекарственные препараты [12]:

Таблица 6. Антиоксидантные системы организма

<b>1) Активные ферментативные механизмы</b>	
Название	Субстраты
Cu,Zn–СОД (цитоплазма, плазма крови)	O <sub>2</sub> <sup>-</sup>
Mn–СОД (митохондрии)	
Каталаза (пероксисомы, плазма крови)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , нитрит
NAD(P)H : хинонредуктаза (DT-диафораза) (плазматическая мембрана, цитоплазма)	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> (редокс-цикл хинонов)
<i>Пероксидазы:</i> Se-глутатионпероксидаза (плазма крови, цитоплазма)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , гидроперекиси липидов
Глутатионпероксидаза фосфолипидов (мембраны)	
Глутатионтрансферазы	Органические перекиси
<b>2) Неферментативные механизмы прямого действия (ловушки радикалов)</b>	
<i>Жирорастворимые соединения:</i> токоферолы, каротиноиды, витамин А, убихинон, стероидные гормоны	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , гидроперекиси липидов, пероксильные радикалы
<i>Водорастворимые соединения:</i> аскорбиновая кислота, глутатион, метионин и другие соединения с SH-группой, металлотионеины, полифенолы, флавоноиды, мочева кислота, билирубин, витамины группы В (В1, В5, В6)	
<b>3) Молекулы, блокирующие цепи амплификации (хелаторы Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>+</sup>)</b>	
Трансферрин, ферритин, лактоферрин, церулоплазмин	Fe <sup>2+</sup> , Cu <sup>+</sup>
<b>4) Агенты, воздействующие на окисленные макромолекулы и механизмы репарации</b>	
Белки стресса, метионинсульфоксид-редуктаза, протеиназы, метгемоглобин-редуктаза, сывороточный альбумин	Белки
Глутатионпероксидаза	Липиды, белки, нукл.кислоты
Эндонуклеазы, гликозилазы, лигаза	ДНК

**Супероксиддисмутаза** - человеческая эритроцитарная СОД (эрисод) или рекомбинантная СОД (рексоД) – широко применяется при самых различных формах патологии, связанных со свободнорадикальными процессами. Из ферментных препаратов можно отметить также **цитохром С**, обладающий выраженной пероксидазной активностью, которая обуславливает его антиоксидантные и антигипоксические свойства.



**Витамин Е (α-токоферол)** как один из наиболее эффективных антиоксидантов прямого действия («свэвенджеров свободных радикалов») находит применение в самых различных областях медицины. Некоторые другие витаминные препараты (**табл. 6**) также обладают антиоксидантным действием. Структуру, родственную токоферолам (пространственно затрудненные фенолы), имеет широко распространенный антиоксидантный препарат **дибунол (инол)**: 2,6-дитретбутил-4-метилфенол, а также **убинон (убихинон, коэнзим Q)**. Основное применение последнего – в комплексной терапии ИБС. Несколько отличную структуру имеют **мексидол** (3-окси-6-метил-2-этилпиридина сукцинат) и **олифен (гипоксен)** – Na соль (2,5-дигидроксифенил)-4-тиосульфокислоты, предложенный для повышения работоспособности при повышенных нагрузках и неблагоприятных условиях, при хронических заболеваниях, сопровождающихся гипоксией.

Сульфгидрильные соединения имеют смешанное антиоксидантное/антигипоксантное, а также детоксифицирующее действие как за счет своего восстановительного потенциала, будучи донорами атомов водорода, так и за счет хелатирующего эффекта в отношении ионов тяжелых металлов. К препаратам этого типа относятся, например, **тиоктацид Т (α-липоат)** – препарат, используемый в лечении диабета, неврологических заболеваний, эффективный при ишемии-реперфузии, катаракте, отравлениях тяжелыми металлами и воздействиях радиации, а также **унигиол** (2,3- димеркаптопропансульфонат Na), применяющийся в качестве детоксиканта и антиоксиданта при отравлениях солями тяжелых металлов, сердечными гликозидами, при осложнениях диабета, в комплексной терапии при хроническом алкоголизме, инфаркте миокарда.

**Милдронат**: 3-(2,2,2- триметилгидразиний) пропионат, четвертичный аммоний, имеет структурное сходство с карнитином и обратимо ограничивает карнитинзависимый митохондриальный транспорт жирных кислот. Препарат предложен для улучшения метаболизма при ишемической болезни сердца и повышения устойчивости к физическим нагрузкам.

Антиоксидантное действие является одним из «попутных» эффектов ряда других лекарственных средств, например, **пробукола, арбидола**.

В качестве антигипоксанта предложен препарат **мафусол**, представляющий собой раствор 0,1 М фумарата Na, 0,1 М NaCl, 4 мМ KCl и 1,3 мМ MgCl<sub>2</sub>. Дикарбоновые кислоты цикла Кребса проявляют выраженный антигипоксический эффект. Одной из самых эффективных в этом отношении считается янтарная кислота (сукцинатный шунт дыхательной цепи митохондрий), однако экзогенный сукцинат малоэффективен в силу плохой проницаемости через биологические мембраны, но его можно заменить другим субстратом цикла трикарбоновых кислот – фумаратом, который способен при определенных условиях превращаться в сукцинат [11, 15]. Мафусол нашел широкое применение в неотложной медицине.

В **табл. 7** приводятся полученные нами данные о защитном эффекте ряда препаратов с антиоксидантной и/или антигипоксантной активностью, а также их комбинаций, в отношении токсического воздействия ПГМГХ на эмбриональные фибробласты легкого человека в культуре [3]. При этом защитные препараты использованы нами в клинически адекватных концентрациях, а именно, в расчетных концентрациях в крови пациента при максимальных суточных дозах согласно инструкциям к их применению.

Витамин Е, будучи одним из наиболее эффективных скэвенджеров свободных радикалов, полностью блокировал ПОЛ даже при самых высоких концентрациях токсикантов, хотя по другим показателям токсичности был эффективен только в пределах МТД. Все остальные исследованные препараты за исключением тиоктацида оказались эффективными цитопротекторами по одному или нескольким показателям

токсичности (табл. 7). Следует особо отметить мафусол и унитиол, но наиболее эффективны были сочетания антигипоксанта мафусола и антиоксидантов  $\alpha$ -токоферола и эрисод. Цитохром С достоверно повышал жизнеспособность клеток лишь по тесту восстановления МТТ. Эрисод ингибировал  $Fe^{2+}$ - индуцированное ПОЛ, хотя при концентрации фермента, повышенной в 2,5 раза по сравнению с рекомендованной для клинического применения. Сочетанное введение мафусола и  $\alpha$ -токоферола, а также мафусола и эрисод возвращало к контрольным значениям показатели восстановления МТТ при концентрации ПГМГХ 5 мкг/мл, при этом первое сочетание имело даже стимулирующий эффект – превышение контроля.

Таблица 7. Действие ряда препаратов с антигипоксической/ антиоксидантной активностью, а также их комбинаций, на вызванный ПГМГХ цитотоксический ответ эмбриональных фибробластов человека в культуре.

Показатель Состав среды инкубации	Восстановление МТТ, % от контроля	Активность ЛДГ в среде инкубации, нмоль NADH/мл·мин	Индукцированное ПОЛ, нмоль малонового диальдегида/мл
Контроль	100 ± 1,7	2,45 ± 0,34	0,116 ± 0,024
ПГМГХ, 5 мкг/мл (П)	73,7 ± 2,1	20,46 ± 0,39	0,326 ± 0,007
П + мафусол (мф)	108,1 ± 7,5 *	13,61 ± 1,84	0,274 ± 0,019
П + цитохром С (цит)	83,1 ± 0,8 *	19,69 ± 1,16	0,325 ± 0,029
П + тиоктаид (тио)	68,1 ± 1,8	22,58 ± 0,77	0,287 ± 0,020
П + витамин Е	93,2 ± 4,8 *	12,42 ± 0,97 *	0,005 ± 0,001 * # #
П + МФ + цит	112,5 ± 6,0 *	15,57 ± 0,36 *	0,291 ± 0,017
П + МФ + тио	85,2 ± 2,4 +	22,52 ± 1,50	0,333 ± 0,025
П + МФ + вит.Е	128,0 ± 9,5 *	6,43 ± 1,27* #	0,007 ± 0,003 * # #
П + эрисод	85,5 ± 1,4 +	19,35 ± 1,10	0,295 ± 0,006 +
П + МФ + эрисод	105,7 ± 3,6 *	13,39 ± 0,52 *	0,268 ± 0,029
П + унитиол1	90,4 ± 2,2 *	-----	-----
П + унитиол2	114,7 ± 6,8 *	-----	-----

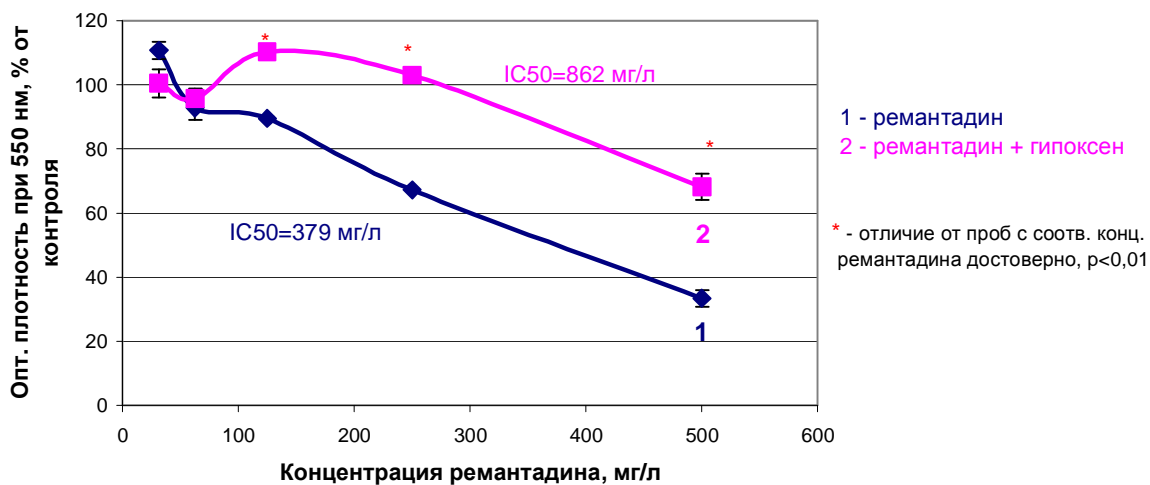
Время инкубации с препаратами - 2 часа в поддерживающей среде.

+  $p < 0,05$ ; \*  $p < 0,01$ : достоверные отличия от проб с соответствующей концентрацией ПГМГХ; #  $p < 0,05$  : достоверное отличие от проб : ПГМГХ + мафусол; ##  $p < 0,01$ : достоверные отличия от всех остальных проб.

Концентрация препаратов составляла: мафусол – 80 мкг/мл (8 мМ фумарата Na), цитохром С - 8 мкг/мл, тиоктаид - 20 мкг/мл (240 мкг/мл), витамин Е - 25 мкг/мл, эрисод – 8 мкг/мл (0,3 мкг/мл), унитиол1 – 50 мкг/мл (0,25 мМ), унитиол2 – 100 мкг/мл (0,5 мМ).

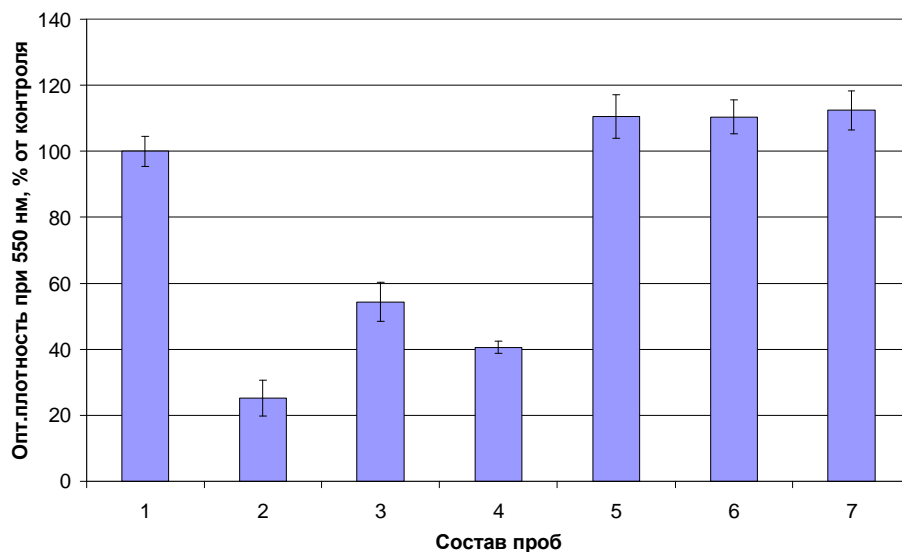
Защитное действие в отношении цитотоксичности, вызванной ремантадином, изучено нами на примере гипоксена (олифена). Соответствующие данные в отношении эмбриональных фибробластов человека представлены на рис.6. IC50 под действием гипоксена (30 мг/л) возрастала с 379 до 862 мг/л при 2-х час инкубации, иными словами имело место уменьшение токсичности ремантадина примерно в 2,3 раза. Защитный эффект в отношении клеток линии MDCK оказался чуть ниже – снижение токсичности в 1,8 раза, но в обоих случаях этот эффект значимый в широких пределах концентраций ремантадина.

**Рис. 6. Действие гипоксена на вызванный ремантадином цитотоксический ответ эмбриональных фибробластов человека в культуре. Показатель токсичности - МТТ.**



Оказалось, что гипоксен способен не только снижать токсическое действие ремантадина, но и усиливать его противовирусную активность. Кроме того, препарат обладал собственным противовирусным действием, полностью предотвращая в исследованной концентрации цитопатическую реакцию клеток в культуре под действием вирусов гриппа (рис.7).

**Рис. 7. Действие ремантадина и гипоксена на цитопатическую реакцию в культурах клеток МДСК, вызванную вирусом гриппа А/Новосибирск/4/04 (H3N2).**



Концентрации: ремантадин-1 – 30 мкг/мл; ремантадин-2 – 10 мкг/мл; гипоксен – 30 мкг/мл. Инкубация с вирусом и препаратами 24 час. Обозначения: 1 – контроль (клетки без воздействия вируса); 2 – вирус; 3 – вирус+ ремантадин-

1; 4 – вирус+ ремантадин-2; 5 – вирус+ гипоксен; 6 – вирус+ ремантадин-1 + гипоксен; 7 – вирус+ ремантадин-2 + гипоксен

Снижение цитопатогенного действия вируса на клетки, вероятно, может объясняться стабилизацией их мембранных систем под действием препарата с комбинированной антиоксидантной/антигипоксической активностью и улучшением их энергетического статуса, что приводит к меньшей чувствительности к вирусной атаке.

Область применения антиоксидантной терапии постоянно расширяется [30, 43]. В литературе обсуждается защитный эффект антиоксидантов *in vitro* в условиях острой токсичности. Например, показано, что прединкубация тканевых срезов почки с восстановленным глутатионом или с  $\alpha$ -токоферолом снижает их чувствительность к токсическому действию атрактилозида. Такой же защитный эффект на срезах печени имели глутатион и дефероксамин [42]. В то же время известно, что при определенных условиях и в избыточной концентрации антиоксидантное действие соединений может обращаться в прооксидантное, поэтому результаты применения *in vivo* повышенных доз антиоксидантов не всегда однозначны [34, 47]. Положительный эффект может достигаться за счет комбинации нескольких цитопротекторов с разным механизмом действия [46]. Так, например, токсичность доксорубина в отношении гепатоцитов крысы в культуре предотвращалась только сочетанным введением витамина Е, пирувата и смеси жирных кислот из яичного желтка, в то время как по отдельности эти компоненты были неэффективны [27].

В нашей работе впервые была использована комбинация антигипоксанта (мафусола) и одного из антиоксидантов (витамин Е, СОД) для эффективной защиты клеток в культуре от токсического воздействия.

В заключение хочется отметить, что изучение показателей клеточного метаболизма на культурах клеток при воздействии различных фармакологических препаратов, в первую очередь антивирусных и антимикробных, способно обеспечить получение достоверной информации прежде всего по таким аспектам как:

1. Скрининг, оценка и выявление наименее токсичных и наиболее эффективных соединений в группах аналогов с близким химическим строением.
2. Определение IC50 для нескольких показателей метаболического состояния клеток, что в значительной степени сокращает количество используемых экспериментальных животных
3. Тестирование противовирусного эффекта по уменьшению цитопатической реакции, выявляемой в комплексе биохимических показателей, и на основе п.п. 1-3 наиболее точный расчет фармакологического индекса *in vitro*
4. Изучение тонких механизмов воздействия препаратов на физиологические функции клеток. При этом важно подчеркнуть, что поскольку исследования часто проводятся на клетках человека, то это является практически единственной возможностью получения экспериментальных данных если и не в отношении человека в целом, то в отношении его клеток и тканей.
5. Существенное сокращение времени и материальных затрат на проведение тестирования по большому количеству показателей.
6. Скрининг цитопротекторных препаратов с оценкой эффективности их защитных свойств. Возможность тестирования с учетом конкретного механизма антиоксидантов и антигипоксантов.
7. Уникальная возможность проведения подбора на клеточном уровне наиболее эффективных комбинаций протективных препаратов для отдельных ксенобиотиков.

## Список цитированной литературы

1. Бауманис Е.А., Бирска И.А., Закенфельд Г.К. и др. Цитологические и иммунологические аспекты противоопухолевого действия полигексаметиленгуанидина у мышей линии BALB/c // Экспер.онкология. – 1989. – Т.11, № 3. – С.66-69.
2. Голубев Д.Б. Ферменты в системах инфицированных вирусами клеток. – Л.: Наука, 1979. – 194 с.
3. Еропкин М.Ю., Еропкина Е.М. Культуры клеток как модельная система исследования токсичности и скрининга цитопротекторных препаратов. – СПб.: Морсар АВ. – 2003. – 239 С.
4. Еропкин М.Ю., Литвинова О.М., Юхнова Л.Г., Смирнова Т.Д. Результаты использования ферментативных маркеров для оценки противовирусного действия хлорофилло-каротиновой пасты. // Современные аспекты вакцинопрофилактики, химиотерапии, эпидемиологии, диагностики гриппа и других вирусных инфекций. Материалы Всеросс. конф. 16-18 апр.2001, С.Петербург, 2001. С. 73-74.
5. Еропкин М.Ю., Смирнова Т.Д., Еропкина Е.М. Метаболическая активация минимальными токсическими дозами ксенобиотиков как общая закономерность острого цитотоксического ответа фибробластов человека в культуре // Токсикол. вестник. – 1999. - № 1. – С.16-21.
6. Еропкина Е.М., Мамаева Е.Г., Еропкин М.Ю. Особенности действия костного цемента на фибробласты человека в культуре и возможные пути его коррекции с помощью цитопротекторных препаратов. // Эксп. клинич. фармакол., 2003, № 5. С. 48-52.
7. Ефимов К.М., Гембицкий П.А., Снежко А.Г. Полигуанидины – класс малотоксичных дезсредств пролонгированного действия // Дезинфекц. дело. – 2000. - № 4.
8. Киселев О.И., Блинов К.Н., Козелецкая К.Н. и др. Молекулярный механизм действия антивирусных препаратов адамантанового ряда // Вестник РАМН. – 1993. - № 3. – С.10-15.
9. Киселев О.И., Деева Э.Г., Слита А.В., Платонов В.Г. Антивирусные препараты для лечения гриппа и ОРЗ. Дизайн препаратов на основе полимеров-носителей. – СПб.: Время, 2000. – 132 с.
10. Кокряков В.Н. Биология антибиотиков животного происхождения. – СПб.: Наука, 1999. – 162 С.
11. Лукьянчук В.Д., Савченкова Л.В. Антигипоксанты: состояние и перспективы // Экспер.клинич.фармакол. – 1998. – Т.61, № 4. – С.72-79.
12. Машковский М.Д. Лекарственные средства. Издание XIII – Харьков: Торсинг, 1997. – Т.1. – 543 с.; Т.2. – 590 с.
13. Подунова Л.Г. (Ред.) Альтернативные методы исследования (экспресс-методы) для токсикологической оценки материалов, изделий и объектов окружающей среды. Методическое пособие. – М., 1999. – 108 с.
14. Селье Г. На уровне целого организма. – М.: Наука, 1972. – 121 с.
15. Смирнов А.В., Криворучко Б.Н. Антигипоксанты в неотложной медицине // Анестезиол. и реаниматол. – 1998. - № 2. – С.50-55.
16. Смирнова Т.Д., Литвинчук Л.Ф., Сизова Л.С., Горностаев В.С. Новый подход к контролю биологических свойств сыворотки крупного рогатого скота // Цитология. – 1996. – Т. 38, № 2. – С.249-250.

17. Франклин Т., Сноу Дж. Биохимия антимикробного действия. – М.: Мир, 1984. – 238 с.
18. Balls M. Validation of alternative tests in the European Union // *Curr.Probl.Dermatol.* – 1995. – V.23. – P.265-274.
19. Balls M., Fentem J.H. The use of basal cytotoxicity and target organ toxicity tests in hazard identification and risk assessment // *ATLA.* – 1992. V.20. – P.368-389.
20. Borenfreund E., Puerner J.A. Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption // *Toxicol.Lett.* – 1985. – V.24. – P.119-124.
21. Clemedson C., Barile F.A., Ekwall B. et al. MEIC evaluation of acute systemic toxicity. // *ATLA.* – 1998. – V.26, Suppl. 1. – P.93-129.
22. Clemedson C., Nordin-Andersson M., Bjerregaard H.F. Development of an *in vitro* test battery for the estimation of acute human systemic toxicity: an outline of the EDIT project // *ATLA.* – 2002. – V. 30. – P. 313-321.
23. Clothier R., Starzec G., Pradel L. et al. The prediction of human skin responses by using the combined *in vitro* fluorescein leakage/Alamar blue (resazurin) assay // *ATLA.* – 2002. - V. 30. – P.493-504.
24. Ekwall B., Clemedson C., Cfafoord B. et al. MEIC evaluation of acute systemic toxicity. Part III. // *ATLA.* – 1998. – V. 26. – Suppl. 2. – P. 571-616.
25. Ekwall B. Overview of the final MEIC results: II. The *in vitro* – *in vivo* evaluation, including the selection of a practical battery of cell tests for prediction of acute lethal blood concentrations in humans // *Toxicol. In Vitro.* – 1999. – V.13, No.4-5. – P.665-673.
26. Ekwall B. The basal cytotoxicity concept // *Alternative Methods in Toxicology.* V.11. / Ed. By A.M.Goldberg, F.M. van Zutphen. – N.Y.: Mary Ann Liebert, 1995. – P.721-725.
27. Gokhale M.S., Lin J.R., Yager J.D. A mixture of antioxidants and fatty acids improves the viability of cultured rat hepatocytes untreated and treated with doxorubicin // *Toxicol. In Vitro.* – 1997. – V.11, No.6. – P.753-759.
28. Grant R.L., Acosta Jr.D., Smith M.A. Experimental models and general mechanisms of toxicity // *Comprehensive Toxicology on CD-ROM.* – Elsevier Sci., 1997. – V.1.
29. Halle W. The registry of cytotoxicity: toxicity testing in cell cultures to predict acute toxicity (LD50) and to reduce testing in animals // *ATLA.* – 2003. – V. 31. – No. 2. – P.89-498.
30. Halliwell B., Gutteridge J.M.C., Cross C.E. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? // *J.Lab.Clin.Med.* – 1992. – V.119, No.6. – P.598-620.
31. Herberman R.B., Reynolds C.W., Ortaldo J. Mechanisms of cytotoxicity of natural killers (NK) cells // *Ann.Rev.Immunol.* – 1986. – V.4. – P.651-680.
32. <http://toxnet.nlm.nih.gov>
33. Jurima-Romet M., Huang H.S., Paul C.J. et al. Enalapril cytotoxicity in primary cultures of rat hepatocytes. I. Effects of cytochrome P-450 inducers and inhibitors // *Toxicol.Lett.* – 1991. – V.58, No.3. – P.256-267.
34. Maiorino M. Prooxidant role of vitamin E in copper induced lipid peroxidation // *FEBS Lett.* – 1993. – V.330, No.2. – P.174-177.
35. McDonnell G., Russell A.D. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance // *Clinical Microbiol. Rev.* – 1999. – V.12. – No. 1. – P. 147-179.
36. Möller G. (ed.) Molecular mechanisms of T-cell mediated lysis // *Immunol.Rev.* – 1988. – V.103.
37. Morgan D.M., Larvin V.L., Pearson J.D. Biochemical characterization of polycation-induced cytotoxicity to human vascular endothelial cells // *J.Cell.Sci.* – 1989. – V.94, No.3. – P.553-559.

38. Morgan D.M.L., Clover J., Pearson J.D. Effects of synthetic polycations on leucine incorporation, lactate dehydrogenase release and morphology of human umbilical vein endothelial cells // *J.Cell.Sci.* – 1988. – V.91, No.2. – P.231-238.
39. Mossmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // *J. Immunol. Methods.* – 1983. – V.65. – P.55-63.
40. Müller-Eberhard H.J. The membrane attack complex of complement // *Ann.Rev.Immunol.* – 1986. – V.4. – P.503-528
41. Nabholz M., MacDonald H.R. Cytolytic T-lymphocytes // *Ann.Rev.Immunol.* – 1983. – V.1. – P.273-306.
42. Obatomi D.K., Brant S., Anthonypillai V. et al. Optimizing preincubation conditions for precision-cut rat kidney and liver tissue slices: effect of culture media and antioxidants // *Toxicol. In Vitro.* – 1998. – V.12, No.6. – P.725-737.
43. Papas A.M. (ed.) Antioxidant status, diet, nutrition and health. – Lond.: CRC Press. – 1999. – 650 p.
44. Pasternak C.A. Transmembrane communication and disease // *Indian J. Biochem.Biophys.* – 1990. – V.27, No.6. – P.363-364.
45. Pucher J.J., Daniel J.C. The effects of chlorhexidine digluconate on human fibroblasts *in vitro* // *J.Periodontol.* – 1992. – V.63, No.6. – P.526-532.
46. Rabl H., Khoschsourur G., Colombo T. et al. A multivitamin infusion prevents lipid peroxidation and improves transplantation performance // *Kidney Internat.* – 1993. – V.43, No.4. – P.912-917.
47. Ward J.A. Should antioxidant vitamins be routinely recommended for older people? // *Drugs & Aging.* – 1998. – V.12, No.3. – P.169-175.
48. Worth A.P., Balls M. (eds.). Alternative (non-animal) methods for chemical testing: current status and future prospects. // *ATLA.* – 2002. – Vol. 30, Suppl. 1. – P.1-125.
49. Young J.D.-E., Liu C.-C. Multiple mechanisms of lymphocyte-mediated killing // *Immunol.Today.* – 1988. – V.9. – P.140-145.