

РАЗНЫЕ АСПЕКТЫ

ОЦЕНКА МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ *in vitro* КАК МОДЕЛЬНАЯ СИСТЕМА ТЕСТИРОВАНИЯ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ПРОТИВОВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ

О. И. Киселев, Е. М. Еропкина, Т. Д. Смирнова, М. Ю. Еропкин, Е. В. Ильинская, В. П. Сухинин, А. Р. Прочуханова, В. В. Зарубаев¹

Предложенная тест-система *in vitro* с оценкой нескольких показателей жизнеспособности монослоя и/или клеточного метаболизма является информативным подходом в скрининговом тестировании лекарственных препаратов. Цитотоксические эффекты противовирусных препаратов (ремантадин и полирем) изучены на клетках млекопитающих в культуре. Результаты короткой двухчасовой экспозиции с исследованными соединениями оказались близкими к показателям LD₅₀, полученным на животных, что делает их предсказательными по токсичности в отношении целого организма. Изучение метаболического состояния клеток в ходе 48-часовой экспозиции позволило выявить большую по сравнению с другими показателями чувствительность к действию противовирусных препаратов со стороны системы эндоцитоза. Продемонстрировано на клеточном уровне, что химическое связывание препарата в полимерный комплекс уменьшает степень его цитотоксичности: установлена меньшая токсичность полимерного комплекса ремантадина — полирема по сравнению с эквимоллярной концентрацией содержащегося в нем ремантадина, а также смеси ремантадина с полимером-носителем (BC-ВАЯК).

Ключевые слова: клетки в культуре, цитотоксичность, противовирусные препараты

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время уже предложено много хорошо стандартизированных методов, а также моделей на базе культур клеток млекопитающих для токсикологической оценки лекарственных препаратов. Используемые подходы для тестирования *in vitro* особенностей действия различных ксенобиотиков, получившие общее название альтернативных методов, имеют четко разработанные критерии, что позволяет соотносить результаты, полученные *in vitro*, с данными *in vivo* [9]. Не менее интенсивно развивается область альтернативных моделей, направленных на изучение механизмов специфической активности лекарственных препаратов. Очевидно, что данные методы и модели имеют наряду со своими принципиальными ограничениями и ряд несомненных преимуществ в тех случаях, когда реализация действия химического соединения в значительной степени направлена непосредственно на отдельные клетки и не опосредуется включением более сложных каскадов реакций на уровне организма [2]. Такими примерами изучения специфической активности является тестирование *in vitro* биоцидных, в частности, противовирусных препаратов, а также соединений, обладающих цитопротекторным эффектом.

Действие токсических агентов вызывает в клетках комплекс взаимосвязанных процессов, приводящих к повреждению целостности биологических мембран и цитоскелета, нарушению синтеза и секреции важнейших молекул, изменению ионного гомеостаза, энергетического статуса клеток и скорости клеточного деления, что сопровождается закономерными повреждениями в ультраструктуре органелл. Поскольку указанные сдвиги в физиологическом статусе важны для любой клетки, следовательно, их проявления и последующая оценка как показателя токсичности ксенобиотика возможны на разных клетках в культуре вне зависимости от их тканевого происхождения и специализации в многоклеточном организме [8].

Задачей настоящего исследования явилось совершенствование информативной модели на базе клеток млекопитающих, а также биохимических и морфологических критериев цитотоксичности, с помощью которой возможно оценивать токсическое действие и определять диапазон безопасных концентраций для перспективных соединений с противовирусной активностью, а также изучать механизм действия исследуемых ксенобиотиков на клетках-мишенях. С этой целью в качестве тест-препаратов мы использовали ремантадин и его полимерный аналог полирем, механизм противовирусного действия которых и токсические эффекты в отношении лабораторных животных хорошо исследованы.

¹ ГУ НИИ гриппа РАМН, Санкт-Петербург, 197376, ул. проф. Попова, 15/17.

Оба агента обладают специфической в отношении вируса гриппа А противовирусной активностью [3, 4, 5]. Они взаимодействуют с мембранами инфицированных клеток, в частности, с отрицательно заряженными фосфолипидами. 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 рецепторзависимого эндоцитоза, декапсидации в фаголизосоме, а также самосборки вирусных частиц и почкования [4]. Полирему помимо специфической в отношении вируса гриппа А активности также свойственен неспецифический характер защиты клеток, обусловленный его способностью блокировать сорбцию различных вирусов [5]. В этой связи препарат обладает более широким в этиологическом отношении эффектом, что показано не только на гриппозной, но и герпетической, цитомегаловирусной и папилломавирусной инфекций в клинике. Немаловажным фактором является и пролонгированный эффект полимера, способствующий длительной циркуляции противовирусного компонента в эффективных терапевтических дозах.

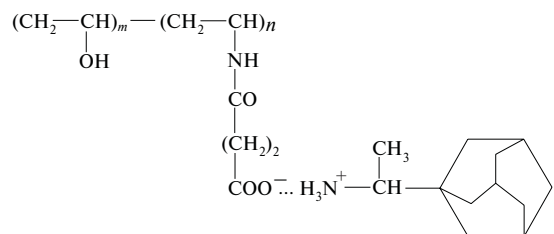
Таким образом, известный механизм противовирусного действия ремантадина и полирема, одним из определяющих моментов которого является влияние на клеточные мембраны, обусловил выбор критериев для оценки цитотоксического действия данных препаратов. В качестве параметров токсического ответа клеток в культуре нами были использованы показатели функционального состояния мембраны — нарушения ее целостности и изменения эндоцитозной активности, а также оценка интенсивности клеточного дыхания, коррелирующей с общей жизнеспособностью монослоя.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клеточные культуры. Работа выполнена на двух эпителиоидных по морфологии клеточных линиях: А-549, карцинома легкого человека и MDCK, почка собаки (коллекция НИИ гриппа РАМН). Для проведения экспериментов клетки рассевали в 24-луночные планшеты в концентрации 150 000 кл/мл (А-549) и 250 000 кл/мл (MDCK) в среде Игла с 10 % сывороткой крупного рогатого скота и выращивали до получения конфлуэнтного монослоя по ранее описанной нами методике [2]. Перед всеми процедурами токсикологического анализа ростовую питательную среду заменяли бессывороточной поддерживающей средой, которая также служила растворителем для исследованных препаратов.

Лекарственные препараты. Ремантадин: 1-(1-адамантил) этиламин гидрохлорид (Aldrich, США) тестировали в конечных концентрациях 10 – 500 мкг/мл. Препарат полирем производства СПб. Технологиче-

ского университета представляет солевой комплекс ремантадина с сополимером винилового спирта и N-виниламидоантарной кислоты:



где $n = 25 \pm 5$; $m = 100 - n$ (m, n — мольные проценты), а мол. масса препарата составляет $25\,000 \pm 5\,000$. Действие полирема на клетки оценивали в концентрациях 250 – 3750 мкг/мл. При определении диапазона исследованных концентраций исходили из учета эффективной терапевтической дозы лекарственных препаратов с некоторым его расширением для получения более полной токсикологической характеристики.

Токсикологический анализ. Активность цитозольного фермента лактатдегидрогеназы (ЛДГ, КФ 1.1.1.27) в среде инкубации измеряли спектрофотометрически по методу [10].

Суммарную активность дыхательных дегидрогеназ выявляли в микротетразолиевом тесте (МТТ) [11]. Эндоцитозную активность оценивали по интенсивности поглощения красителя нейтрального красного по методу [7]. Результаты опытных образцов представлены как процент оптической плотности от таковой в контрольных пробах. Все данные являются средними значениями с учетом ошибки среднего по результатам минимум трех независимых экспериментов. Средние ингибиторные концентрации IC_{50} препаратов рассчитывали из уравнений регрессии, построенных по зависимости доза-эффект. Статистическую и математическую обработку результатов проводили по пакету прикладных программ Statistica (Statsoft Inc, США, 2001).

Электронно-микроскопическое исследование. Изучение ультраструктуры клеток MDCK проводили спустя 72 ч после их культивирования с добавлением в среду ремантадина в конечной концентрации 31 мкг/мл. Контролем служили клетки, выращенные в среде без добавления ксенобиотика. Материал фиксировали в 2,5 % глютаральдегиде на 0,1 М какодилатном буфере и постфиксировали в 1 % четырехоксида осмия на том же буфере. После обезвоживания в этаноле клетки заливали в смесь смол эпона и аралдита. Ультратонкие срезы анализировали в просвечивающем электронном микроскопе JEOL (JEM — 100 S).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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

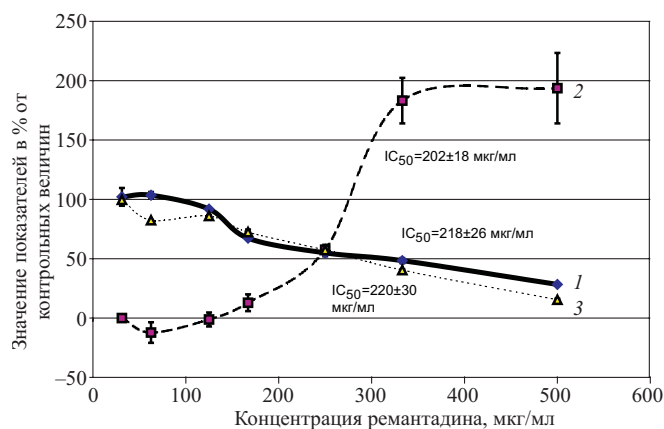


Рис. 1. Цитотоксический эффект ремантадина на культурах клеток А-549 при двухчасовой инкубации.

1 — микротетразолиевый тест, 2 — выход ЛДГ, 3 — поглощение нейтр. красного.

высокой чувствительностью к качеству компонентов питательной среды и обычно используются для тестирования ее ростовых свойств и токсичности [6]. Перевиваемая клеточная линия MDCK, полученная из почек щенка спаниеля в 1958 г., 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 цитозольного фермента лактатдегидрогеназы, который может быть использован как маркер нарушения целостности клеточной мембраны; 2) снижению суммарной активности митохондриальных дегидрогеназ в микротетразолиевом тесте (МТТ), отражающей ингибирование интенсивности клеточного дыхания; 3) уменьшению эндочитоза витального красителя нейтрального красного, коррелирующему с лизосомальной функцией.

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 двухчасовой инкубации клеток А-549 с ремантадином в диапазоне концентраций от 10 до 500 мкг/мл показано, что концентрация препарата IC_{50} , ингибирующая на 50 % клеточные функции, которые мы использовали как маркерные в нашем исследовании, составляет приблизительно 200 мкг/мл (рис. 1). Полученные в данных условиях IC_{50} для трех показателей совпадают с оценкой LD_{50} ремантадина, равной 160–220 мг/кг при внутрибрюшинном введении мышам (с учетом небольшой средней плотности тканей это значение можно условно считать эквивалентным 160–200 мкг/мл *in vitro*). Следовательно, клеточная модель с указанными

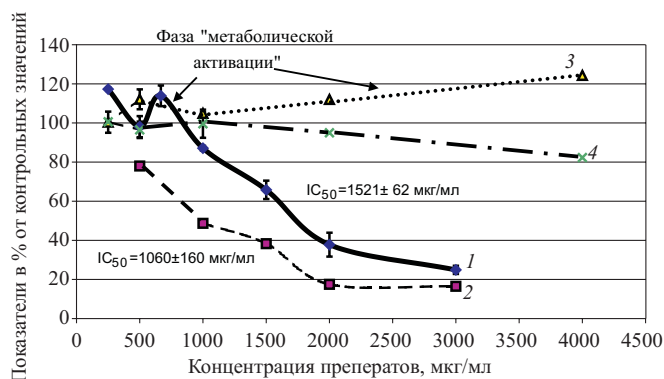


Рис. 2. Цитотоксический эффект полирема и его полимерного носителя (сополимера винилового спирта и N-виниламидоэтановой кислоты) на культурах клеток А-549.

1 — полирем, микротетразолиевый тест, 2 — полирем, погл. нейтр. красного, 3 — носитель, микротетразолиевый тест, 4 — носитель, погл. нейтр. красного.

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 полирема с результатами тестирования на лабораторных животных. LD_{50} при внутрибрюшинном введении у мышей составила 1130–1300 мг/кг, тогда как IC_{50} в тесте МТТ соответствовала 1521 ± 62 мкг/мл, а по поглощению красителя нейтрального красного — 1060 ± 160 мкг/мл (рис. 2). Следует обратить внимание на то, 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, эндочитозная активность оказалась ингибированной наполовину под действием дозы полирема в 1,5 раза ниже, чем IC_{50} в отношении клеточного дыхания. Для ремантадина сходный характер влияния на исследованные показатели метаболического состояния клеток проявлялся только при длительной, 24–48-часовой экспозиции, когда эндочитозная активность также оказалась более чувствительной к действию препарата (рис. 3). Помимо этого, при удлинении времени инкубации монослоя с ксенобиотиком пропорционально усиливались метаболические нарушения и IC_{50} к концу вторых суток существенно понижались по сравнению с двухчасовой экспозицией с препаратами.

На рис. 3 представлены данные, полученные параллельно на двух клеточных линиях — А-549 и MDCK. Отличия токсикологических параметров на этих двух линиях клеток были незначительными: так, IC_{50} в тесте поглощения нейтрального красного составили для клеток А-549 — $58,8 \pm 6,2$ мкг/мл, а для MDCK — $59,5 \pm 5,5$ мкг/мл, в тесте МТТ — $82,7 \pm 5,8$ и $74,5 \pm 4,9$ мкг/мл соответственно. Отсутствие достоверных отличий токсического действия испытанных

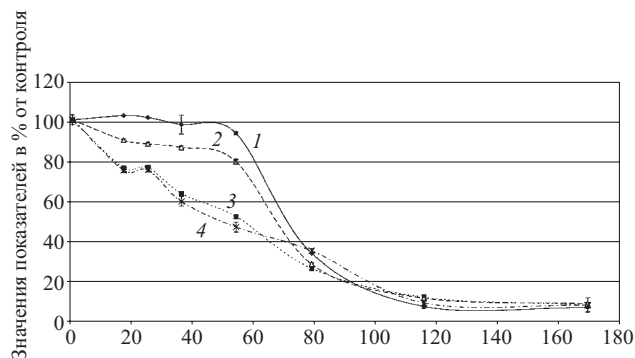


Рис. 3. Цитотоксический эффект ремантадина на культурах клеток A-549 и MDCK при 48-часовой инкубации.

1 — клетки A-549, микротетразолиевый тест, 2 — клетки MDCK, микротетразолиевый тест, 3 — клетки A-549, погл. нейтр. красного, 4 — клетки MDCK, погл. нейтр. красного.

препаратов в отношении обеих клеточных линий наблюдалось нами при всех схемах опытов и для всех показателей токсичности. Это подтверждает отмеченный нами ранее очень слабый вклад тканевого происхождения клеточной линии (в пределах класса млекопитающих) в характер острого токсического ответа *in vitro* [2].

На электронно-микроскопическом уровне в клетках MDCK после 72-часовой экспозиции с ремантадином выявлен ряд изменений, свидетельствующих о существенных нарушениях их функционального состояния. В цитоплазме обнаружено большое количество ламинарных телец. В данном случае однозначно определить, какие из органелл перерождаются в подобные тельца, не представлялось возможным. В контроле милоподобные образования встречались, но очень редко. Помимо ламинарных телец в цитоплазме клеток под действием ремантадина нередко обнаруживались гигантские аутофагосомы, содержащие фрагменты мембранных конгломератов и митохондрий. В клетках MDCK при длительном культивировании обычно возрастает количество фагосом и лизосом, но в 72-часовом контрольном материале подобные структуры не обнаруживались. Значительные изменения затрагивали также энергетический аппарат клеток, культивируемых с ремантадином. При этом отмечено, что многие митохондрии имели лишь единичные кристы либо обнаруживалась их полная утрата. У части органелл наряду с потерей крист наблюдался также разрыв наружной мембраны.

Сравнительный токсикологический анализ двух препаратов 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 влияние самого препарата на клетки, но и его носителя — сополимера винилового спирта и N-виниламидоуксусной кислоты (ВС-ВАЯК). На рис. 2 пред-

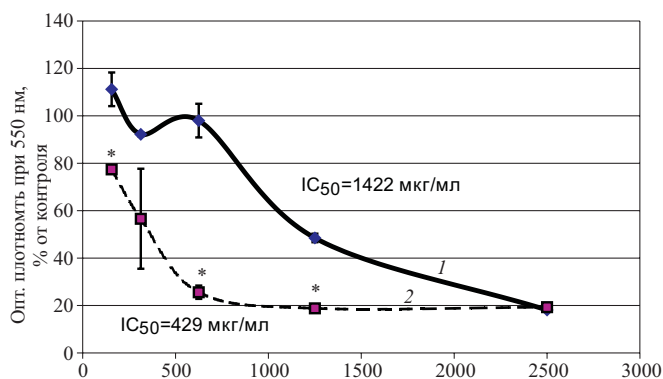


Рис. 4. Цитотоксический эффект полирема и эквимольной смеси ремантадина с полимерным носителем (ВС-ВАЯК) на культурах клеток A-549. Показатель токсичности — МТТ.

1 — полирем, 2 — смесь ремантадин 38 % и ВС-ВАЯК 62 %. * — отличие от соответствующей концентрации полимера достоверно, $p < 0,05$.

ставлены результаты данного анализа. Как следует из полученных данных, полимерный носитель в широком диапазоне концентраций от 250 до 3750 мкг/мл собственной токсичностью не обладал, в связи с чем IC_{50} 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, эквимольных их содержанию в полиреме, показало, что токсичность смеси оставалась в 3,3 раза выше, чем у полирема и соответствовала таковой мономерного ремантадина (рис. 4).

Полученные 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 особенно оправдан в случае сравнительной оценки влияния близких по определенным параметрам лекарственных соединений, как, например, низкомолекулярного ремантадина и его полимерного производного полирема [1, 2]. 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 препа-

рата связан со стимулирующим иммунный ответ и продукцию интерферона действием входящего в него сополимера ВС-ВАЯК [5]. 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 [1]. 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 % 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_{50} , ингибирующая эндоцитоз красителя нейтрального красного, была в 1,5 раза ниже, чем концентрация препарата, вызывавшая 50 % 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 ч. Дозозависимое подавление ремантадином интенсивности клеточного дыхания, регистрируемое по снижению суммарной активности митохондриальных дегидрогеназ, сопровождалось выраженными нарушениями в ультраструктуре этих органелл. Как известно, митохондрии являются одним из наиболее пластичных компонентов клетки и легко поддаются адаптивной перестройке, а количество и степень их развития определяются функциональной активностью клетки. При этом уменьшение или полная потеря крист являются обратимым процессом. Наружная митохондриальная мембрана способна лишь к необратимому растяжению, ведущему к разрыву. Проведенное ультраструктурное исследование клеток в присутствии ремантадина выявило не только уменьшение количества крист в митохондриях, но и нарушение целостности наружной

мембраны, причем в дозе, только в полтора раза отличающейся от средней терапевтической.

Варьирование длительности экспозиции клеток с тестируемыми препаратами позволило подобрать условия не только наиболее адекватные для предсказания LD_{50} *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 % подавлению основных клеточных функций, которые в пересчете хорошо совпадают с показателями LD_{50} , полученными на экспериментальных животных. Иными словами, клеточную тест-систему с определенными параметрами можно использовать в скрининговых исследованиях предполагаемых лекарственных препаратов как предсказательную в отношении LD_{50} для целого организма.

В заключение следует отметить, что любое доклиническое тестирование токсичности лекарственных препаратов протекает в модельных системах, каковыми являются модели как *in vivo* с использованием лабораторных животных, так и *in vitro* на базе культур клеток. В обоих случаях интерпретация результатов в большей или меньшей степени носит характер вероятностной аппроксимации. Результаты международной межлабораторной программы МЕИС по валидации так называемых альтернативных методов продемонстрировали, что предсказание острых концентраций в крови у человека LC_{50} для 50-эталонных соединений по IC_{50} , полученных в десяти тестах на клеточных линиях млекопитающих, точнее отражает токсичность этих препаратов (коэффициент детерминации $R^2 = 0,74$), чем сравнение с LD_{50} для крыс и мышей тех же эталонных соединений ($R^2 = 0,60 - 0,66$) [9].

ВЫВОДЫ

1. Предложенная тест-система для токсикологического анализа лекарственных препаратов в отношении клеток в культуре по нескольким показателям жизнеспособности и/или метаболизма является наиболее информативной для сравнительной оценки соединений с близкими свойствами (ремантадин-полирем) и может быть использована в скрининговом тестировании новых фармакологических агентов.

2. Результаты короткой двухчасовой экспозиции клеток с исследованными ксенобиотиками оказались близкими к показателям LD_{50} , полученным на животных, что делает их предсказательными по токсичности в отношении целого организма. Отсутствие сущест-

венных различий IC_{50} , полученных тремя методами (выход ЛДГ, поглощение нейтрального красного, МТТ) позволяет использовать любой из них для сравнительных исследований токсичности *in vitro/in vivo*.

3. В ходе 48-часовой экспозиции выявлена большая чувствительность к исследованным препаратам системы эндцитоза клеток (тест поглощения нейтрального красного) по сравнению с другими метаболическими показателями.

4. На клеточном уровне продемонстрирована меньшая токсичность полимерного комплекса ремантадина — полирема по сравнению с эквимольной концентрацией содержащегося в нем ремантадина, а также смеси ремантадина с полимером-носителем (ВС-ВАЯК).

ЛИТЕРАТУРА

1. М. Ю. Еропкин, Т. Д. Смирнова, Е. М. Еропкина, *Токсикол. вестник*, **1**, 16 – 21 (1999).
2. М. Ю. Еропкин, Е. М. Еропкина, *Культуры клеток как модельная система исследования токсичности и скрининга*

- цитопротекторных препаратов*, Морсар АВ, С-Петербург (2003).
3. Е. И. Ефимов, С. А. Разгулин, *Воен. мед. ж.*, **80**(2), 48 – 49 (1995).
 4. О. И. Киселев, В. М. Блинов, К. И. Козелецкая и др., *Вестник РАМН*, **3**, 10 – 15 (1993).
 5. О. И. Киселев, Э. Г. Деева, А. В. Слита, В. Г. Платонов, *Антивирусные препараты для лечения гриппа и ОРЗ. Дизайн препаратов на основе полимерных носителей*, “Время”, С.-Петербург (2000).
 6. Т. Д. Смирнова, Л. Ф. Литвинчук, Л. С. Сизова, В. С. Горностаев, *Цитология*, **2**(38), 249 – 250 (1996).
 7. E. Borenfreund and J. A. Puerner, *Toxicol. Letters*, **24**, 119 – 124 (1985).
 8. C. Clemedson, E. McFarlane-Abdulla, M. Andersson et al., *ATLA*, **24**(Suppl.1), 251 – 311 (1996).
 9. C. Clemedson, M. Nordin-Andersson, and H. F. Bjerregaard, *ATLA*, **30**(3) 313 – 321 (2002).
 10. *Methoden der enzymatischen Analyse*, H. U. Bergmeyer (Ed.), Akad. Verlag, Berlin (1970), 1, 441 – 442.
 11. T. Mosmann, *J. Immunol Meth*, **65**(1), 55 – 63 (1983).

Поступила 13.01.05

EVALUATION OF METABOLIC PARAMETERS *in vitro* AS A MODEL FOR TESTING THE CYTOTOXICITY OF ANTIVIRAL DRUGS

O. I. Kiselev, E. M. Eroпкиna, T. D. Smirnova, M. Yu. Eroпкиn, E. V. Il'inskaya, V. P. Sukhinin, A. R. Prochukhanova, and V. V. Zarubaev

Institute of Influenza, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Prof. Popova 15/17, St. Petersburg, 197376 Russia

A new test system based on *in vitro* assessment of the cellular viability and/or metabolism is proposed, which offers an informative approach to the screening of antiviral drugs. Cytotoxic effects of the antiviral drugs rimantadine and polyrem were studied on the cultures of some mammalian cells. The results of short-term (2 h) exposures with the drugs tested were close to their LD_{50} values in mammals, which makes the proposed test system promising for the assessment of drug toxicity *in vivo* for the whole organism. A study of the state of cell metabolism after a long-term (48 h) exposure showed that the system of endocytosis is more sensitive than other indices with respect to antiviral drugs. It was demonstrated on the cell level that the binding of drugs into polymeric complexes can decrease the degree of its cytotoxicity: the toxicity of polyrem (a polymeric complex of rimantadine) was lower as compared to that of the equimolar concentration of rimantadine or a mixture of rimantadine with a polymeric carrier.