

ВЛИЯНИЕ ТИОТРИАЗОЛИНА И МИЛДРОНАТА НА КУЛЬТУРУ КЛЕТОК НЕЙРОБЛАСТОМЫ ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ РТУТИ ХЛОРИДА

Поступила 15.05.15

Исследовали токсическое влияние ртути (II) хлорида (10.9 мкМ) на культуру клеток нейробластомы IMR-32 и возможные протективные эффекты антиоксиданта тиотриазолина и кардиопротектора милдроната (концентрации в культуральной среде 0.01–10.0 мг/мл). Изолированное добавление тиотриазолина и комбинации тиотриазолин + милдронат к среде не вызывало значительных негативных эффектов (количество погибших клеток при всех указанных концентрациях не превышало 7–10 % популяции в контрольных условиях). Тиотриазолин в концентрациях 0.1 и 0.01 мг/мл демонстрировал существенную нейропротекторную активность в условиях токсического действия ртути (II) хлорида: среднее количество живых клеток в таких условиях культивирования составляло порядка 83 % по сравнению с 54.7 % в случае изолированного действия HgCl₂. Среднее количество живых морфологически не измененных клеток, культивируемых в среде с 10.9 мкМ HgCl₂ с добавлением комбинации милдроната с тиотриазолином, достигало 90.7% контрольного значения, принятого за 100 %. Таким образом, в условиях токсического действия HgCl₂ на культуру клеток нейробластомы IMR-32 комбинация милдроната с тиотриазолином продемонстрировала существенный протективный эффект, более интенсивный, чем таковой у тиотриазолина, применяемого изолированно. Тиотриазолин в концентрациях 0.001–0.1 мг/мл не оказывал значительного негативного воздействия на исследуемую культуру клеток нейробластомы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: интоксикация, культура клеток, нейробластома IMR-32, ртути (II) хлорид, тиотриазолин, милдронат, нейробласт.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время ртуть весьма широко используется в производстве и медицине. Кроме того, существенное поступление ртути в окружающую среду происходит в результате естественного процесса – высвобождения данного элемента из минералов земной коры. Ртуть и ее соединения даже в небольших концентрациях оказывают интенсивное вредное влияние на организм человека, особенно на сердечно-сосудистую и нервную системы [1–3]. В связи с этим поиск препаратов, потенциально способных защищать ЦНС в условиях интоксикации

ртутью, представляет собой весьма актуальную задачу [4, 5].

Тиотриазолин – оригинальный препарат, разработанный в Украине, – обладает противоишемическим, мембраностабилизирующим, антиоксидантным и комплексобразующим действием [5]. Мы предположили, что данный препарат может оказаться перспективным нейропротектором при хроническом воздействии ртути. В нашей предыдущей работе [6] было продемонстрировано, что подобными свойствами в условиях *in vitro* обладает такой препарат, как милдронат.

В настоящей работе мы попытались оценить особенности изолированного и совместного использования двух упомянутых агентов (тиотриазолина и милдроната) в условиях *in vitro* – при токсическом воздействии ртути (II) хлорида (сулемы) на культуру клеток нейробластомы человека.

¹ Национальный медицинский университет им. А. А. Богомольца МЗ Украины, Киев (Украина).

Эл. почта: l-sokurenko@i.ua (Л. М. Сокуренок);
yuchaiko@i.ua (Ю. Б. Чайковский).

МЕТОДИКА

В экспериментах использовали метод двойного серийного культивирования клеток линии IMR-32 (нейробластомы человека). Культуры готовили в стандартных условиях; культивируемые клетки образовывали монослой. Данная линия культивируемых клеток была выбрана с учетом того, что она получена из организма человека, ее сравнительно легко выращивать и она является нейрогенной (ее клетки способны дифференцироваться в нейроноподобные элементы; это позволяет в определенной степени экстраполировать получаемые результаты на нервные клетки).

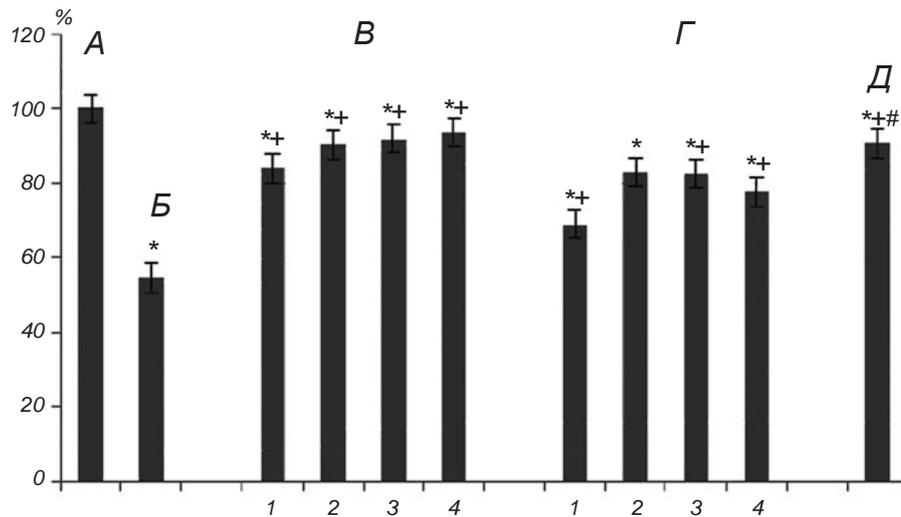
Клетки IMR-32 культивировали при 37 °С в полной среде RPMI 1640 с добавлением 4 мМ L-глутамин и 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (все компоненты от «Sigma», США) в увлажненной воздушной среде, содержащей в себе 5 % CO₂. Среду заменяли через день; пересев клеток производили раз в четыре дня. После двух недель культивирования культуральную среду заменяли средой идентичного состава, но содержащую в себе 10.9 мкМ HgCl₂. Культивирование в присутствии данного токсиканта производили в трех параллельных рядах. Клетки, культивированные без добавления ртути хлорида, служили контролем. Чувствительность клеток IMR-32 к действию ртути хлорида, тиотриазолина, комбинации тиотриазолина и милдроната, а также HgCl₂ в присутствии комбинации двух указанных агентов оценивали в нативных неокрашенных препаратах и после окрашивания трипановым синим, по Май-Грюнвальду. Концентрацию тиотриазолина в культуральной среде варьировали в пределах 0.001–1.0 мг/мл. Милдронат использовали в концентрации 0.1 мг/мл, в которой он продемонстрировал относительную безопасность и оптимальную эффективность протективного действия *in vitro* в предыдущем исследовании [6]. Клетки подсчитывали с применением гемоцитометра в пределах поля зрения при стандартном увеличении и определяли относительное количество (%) живых единиц (Me (0.5L; 0.5U; n = 12) в тех или иных условиях. Межгрупповые сравнения при отсутствии доказательств нормальности распределений выполняли с помощью непараметрического критерия Манна–Утн–Вилкоксона.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В условиях культивирования линии IMR-32 в контроле (в отсутствие в среде как HgCl₂, так и предполагаемых нейропротекторов) в неокрашенных культурах наблюдались относительно крупные фибробластические и мелкие нейробластические единицы, имевшие разнообразную форму – веретенообразную или полигональную с несколькими отростками. В контрольных условиях присутствовали также клетки с нарушенным строением и остатки мембранных структур разрушенных клеток. Относительное количество подобных элементов, подвергшихся деструкции, в контрольных культурах не превышало 4–5 % общего количества наблюдаемых клеточных элементов. Среднее количество клеток IMR-32, демонстрирующих нормальные морфологические характеристики в контрольных культурах, было принято за 100 %, и все дальнейшие расчеты производились относительно этого значения (рис. 1, А).

В образцах культур, выращенных в условиях добавления в среду тиотриазолина, относительное количество нормальных клеток оказалось несколько меньшим, чем в контроле, но подобное уменьшение было весьма умеренным. В частности, в случае наличия в среде 0.001 мг/мл тиотриазолина относительное количество живых клеток составляло в среднем 93.6 % (92.5–94.7 %). При более высоких концентрациях данного препарата (0.1 и 0.01 мг/мл) этот показатель был весьма близким к упомянутому выше. В случае добавления к среде тиотриазолина в максимальной тестированной концентрации нормированное количество жизнеспособных клеток составляло 83.2 %. Все значения этих показателей достоверно отличались от соответствующего значения в контрольных культурах (принятого, как указывалось выше, за 100 %), но оставались достаточно близкими к контрольной величине (рис. 1, В).

На окрашенных препаратах культуры клеток IMR-32 в условиях изолированного применения тиотриазолина наблюдались округлые клетки различного размера. Среди них преобладали большие светлые единицы; в меньшем количестве отмечались небольшие базофильные клетки с относительно крупными ядрами (занимающими почти все поперечное сечение клетки). В таких препара-



Р и с. 1. Относительные количества (%) живых морфологически неизмененных клеток нейробластомы при культивировании линии IMR-32.

A – в условиях контроля (для последующих расчетов показатель принят за 100 %); *Б–Д* – в присутствии в культуральной среде 10.9 мкМ ртути (II) хлорида (*Б*), тиотриазолина (*В*), одновременного присутствия ртути хлорида и тиотриазолина (*Г*) и одновременного присутствия ртути хлорида, милдроната и 0.1 мг/мл тиотриазолина (*Д*). На *В* и *Г* концентрация тиотриазолина 1.0, 0.1, 0.01 и 0.001 мг/мл (для 1–4 соответственно). Звездочкой обозначены случаи достоверного различия ($P < 0.05$) при сравнении с контролем, крестиком – при сравнении с показателем в условиях изолированного действия ртути хлорида, решеткой – при сравнении с показателем в случае одновременного присутствия ртути хлорида и тиотриазолина.

Р и с. 1. Відносні кількості (%) живих морфологічно незмінених клітин нейробластоми при культивуванні лінії IMR-32.

тах достаточно часто наблюдались клетки с признаками деления; их относительное количество было большим при низких концентрациях тиотриазолина.

В культурах клеток IMR-32, выращенных в условиях наличия в среде 10.9 мкМ HgCl₂, относительное количество живых неповрежденных единиц было почти вдвое меньшим (54.7 (51.8; 57.5) %; рис. 1, *Б*), чем в контрольных культурах. Для неокрашенных препаратов культуры, подвергнутой воздействию 10.9 мкМ HgCl₂, было характерно наличие большого количества поврежденных клеток; картина повреждений, обусловленных действием данного токсиканта (рис. 2, *Б*), оказалась весьма разнообразной и была описана нами ранее [6].

Если же в культуральную среду с присутствием HgCl₂ добавлялся тиотриазолин, количество поврежденных клеток было также довольно значительным, но заметно меньшим, чем при действии хлорида ртути без протекции. Наибольшие относительные количества структурно неповрежденных клеток в условиях ртутной интоксикации наблюдались в случае применения тиотриазолина в концентрациях 0.01 и 0.1 мг/мл (82.6 (81.2; 84.0) и 83.0 (81.2; 84.8) % относительно контрольного индекса

соответственно; рис. 1, *Г*). В неокрашенных препаратах культуры, подвергнутой токсическому действию ртути и одновременному воздействию тиотриазолина, присутствовали относительно крупные морфологически интактные клетки фибробластического ряда и небольшие полиморфные единицы с короткими отростками (рис. 2, *В*). Остатки разрушенных клеточных элементов наблюдались в условиях токсического воздействия ртути и одновременного наличия тиотриазолина в среде в заметно меньших количествах.

На окрашенных препаратах культуры клеток, подвергнутых интоксикации HgCl₂ и одновременному воздействию тиотриазолина, можно было выявить заметно большее количество крупных «светлых» и мелких крупноядерных клеток, чем в условиях культивирования без воздействия предполагаемого протектора. Как и в неокрашенных препаратах, остатки разрушенных клеток наблюдались в условиях наличия тиотриазолина в меньших количествах, чем без применения последнего. Клетки, в которых присутствовали ядра с проявлениями митоза, также обнаруживались чаще, чем в «интоксичированных» культурах без воздействия тиотриазолина.

Как видно, эффективность протективного действия тиотриазолина при упомянутых выше двух концентрациях этого вещества оказалась весьма близкой. Значения нормированного количества живых клеток в описанных выше условиях были достоверно меньшими ($P < 0.05$), чем в контроле (в отсутствие токсиканта и предполагаемого протектора), но в то же время достоверно большими ($P < 0.001$), чем в «интоксцированных» культурах в отсутствие предполагаемого тестируемого протектора.

В случаях культивирования клеток нейробластомы при наличии в среде 10.9 мкМ HgCl_2 и комбинации тиотриазолина (0.01 мг/мл) с милдронатом относительное количество живых морфологически неизмененных клеток составляло в среднем 90.7% ($90.6\text{--}90.9 \%$; рис. 1, Д). Этот показатель был достоверно меньшим, чем в контроле ($P < 0.05$), но намного превышал наблюдаемый в условиях изолированного токсического действия ртути хлорида ($P < 0.001$). Одновременно он был несколько (также достоверно) большим, чем в случаях изолированного действия тиотриазолина ($P < 0.05$). Морфологические характеристики клеток в культурах данной

группы принципиально не отличались от таковых у клеток интактных культур и культур, подвергнутых изолированному действию тиотриазолина. В монослое присутствовали круглые клетки с выраженными отростками и мелкие (предположительно нейробластические) единицы. Форма клеток была разнообразной – веретенообразной, треугольной, полигональной. Количество отростков варьировало от двух до нескольких. Деструктивно измененные клетки наблюдались в меньшем количестве, чем в условиях «монопотекции». При комбинированном действии милдроната и тиотриазолина в культурах, подвергнутых действию HgCl_2 , обнаруживалось определенное преобладание мелких базофильных клеток с крупными ядрами (предположительно нейробластов). Клетки размещались достаточно плотно. Признаки митоза в клетках отмечались заметно чаще, чем в условиях монопотекции. Следует упомянуть, что в указанных выше условиях ($\text{HgCl}_2 + \text{тиотриазолин} + \text{милдронат}$) наблюдались большее количество клеток, связанных между собой цитоплазматическими мостиками (рис. 2, В).

Таким образом, тиотриазолин в условиях его изолированного применения в концентрациях 0.1--

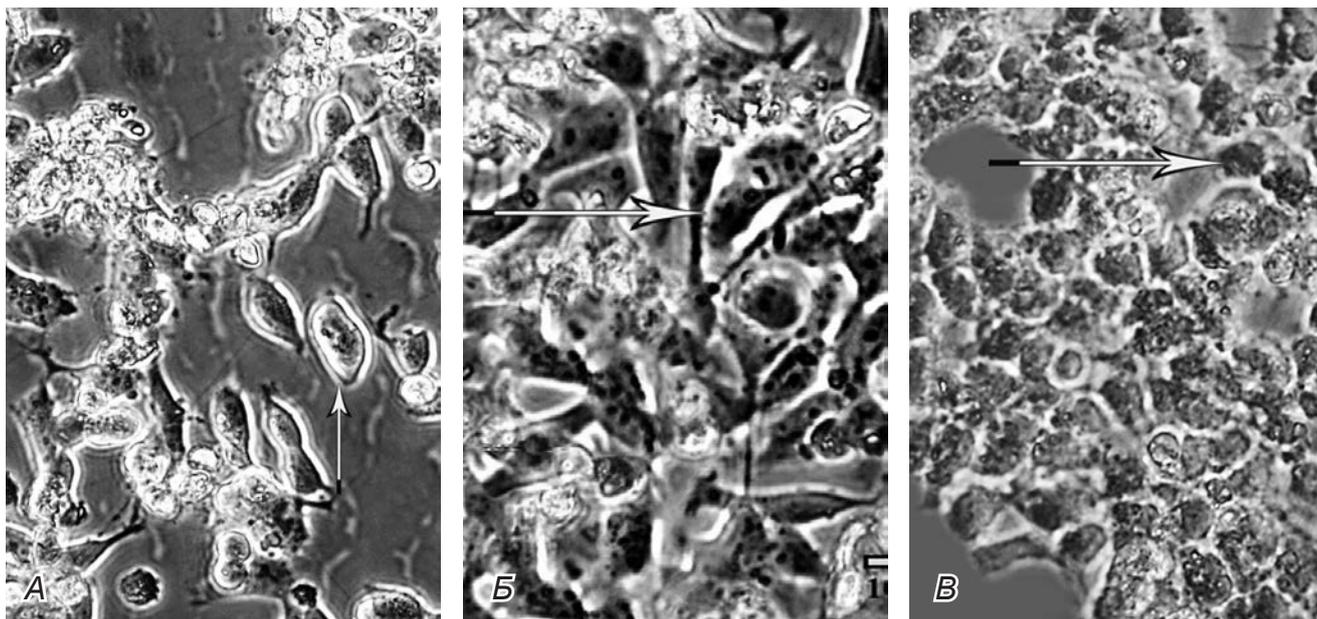


Рис. 2. Клетки нейробластомы в различных условиях культивирования.

А – ограниченное количество живых клеток в присутствии в культуральной среде 10.9 мкМ ртути хлорида; Б – большее количество живых клеток в присутствии ртути хлорида в условиях протекции тиотриазолином; В – преобладание живых клеток в присутствии ртути хлорида в условиях протекции комбинацией тиотриазолина и милдроната. Живые клетки указаны стрелками.

Рис. 2. Клітини нейробластоми в різних умовах культивування.

0.001 мг/мл не оказывал выраженного негативного воздействия на культивируемые клетки нейробластомы линии IMR-32. Использование максимальной тестированной концентрации (1.0 мг/мл) оказывало некоторое угнетающее действие на культуру, но интенсивность такого воздействия вряд ли можно квалифицировать как драматическое. Тиотриазолин, добавленный в среду культивирования клеток нейробластомы в присутствии 10.9 мкМ ртути (II) хлорида, демонстрировал весьма интенсивное протективное воздействие, резко увеличивая количество живых морфологически неизменных клеток. Высокая эффективность тиотриазолина наблюдалась в весьма широком диапазоне концентраций (0.1–0.001 мг/мл). Концентрация 0.1 мг/мл указанного агента оказалась достаточно безопасной, а эффективность протективного действия при данной концентрации – высокой. Это дает возможность рекомендовать именно данную концентрацию тиотриазолина в комбинации с милдронатом. Значительная протективная активность последнего агента была обнаружена в нашей предыдущей работе и подтверждена рядом других авторов [7–10].

Применение комбинации милдроната с тиотриазолином для противодействия токсическим эффектам ртути (II) хлорида показало, что совместное позитивное действие этих двух агентов несколько превышает действие каждого из них в отдельности. Морфологические характеристики клеток культуры, подвергнутых действию токсиканта (HgCl_2), в условиях применения указанной комбинации приближаются к таковым, наблюдаемым в контроле. Относительное количество живых клеток в данной группе культур не достигает контрольных значений, но в то же время оно существенно больше, чем наблюдаемое в случае действия ртути без протекции и в условиях монопротекции тиотриазолином. Таким образом, комбинация тиотриазолина с милдронатом в условиях ртутной интоксикации культуры клеток нейробластомы демонстрирует усиление цитопротекторных свойств указанных агентов при сохранении достаточно высокого уровня безопасности.

Исследование было проведено на культуре клеток, любезно предоставленной нам с банка культуры клеток Института экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины, и выполнено при содействии проф. Ю. Й. Кудрявца.

Поскольку работа проведена *in vitro* на культуре клеток, подтверждения существующих этических норм для исследований на людях и животных не требуется.

Авторы данной работы – Л. М. Сокуренько и Ю. Б. Чайковский – подтверждают отсутствие конфликтов любого рода, касающихся коммерческих или финансовых отношений, отношений с организациями или лицами, которые каким-либо образом могли быть связаны с исследованием, а также взаимоотношений соавторов статьи.

Л. М. Сокуренько¹, Ю. Б. Чайковский¹

ВПЛИВ ТІОТРИАЗОЛІНУ ТА МІЛДРОНАТУ НА КУЛЬТУРУ КЛІТИН НЕЙРОБЛАСТОМИ ПРИ ТОКСИЧНІЙ ДІЇ РТУТІ ХЛОРИДУ

¹ Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця МОЗ України, Київ (Україна).

Резюме

Досліджували токсичний вплив ртуті (II) хлориду (10.9 мкМ) на культуру клітин нейробластоми IMR-32 і можливі протективні ефекти антиоксиданту тиотриазоліну та кардіопротектора милдронату (концентрації в культуральному середовищі 0.01–10.0 мг/мл). Ізольоване додавання тиотриазоліну та комбінації тиотриазолін + милдронат до середовища не викликало значних негативних ефектів (кількість загинлих клітин при всіх вказаних концентраціях не перевищувала 7–10 % популяції в контрольних умовах). Тиотриазолін у концентраціях 0.1 і 0.01 мг/мл демонстрував істотну нейропротекторну активність в умовах токсичної дії ртуті (II) хлориду: середня кількість живих клітин у таких умовах культивування складала порядку 83 % порівняно з 54.7 % у разі ізольованої дії HgCl_2 . Середня кількість живих морфологічно незмінених клітин, культивованих у середовищі з 10.9 мкМ HgCl_2 з додаванням комбінації милдронату з тиотриазоліном, сягала 90.7 % контрольного значення, прийнятого за 100 %. Таким чином, в умовах токсичної дії HgCl_2 на культуру клітин нейробластоми IMR-32 комбінація милдронату з тиотриазоліном продемонструвала істотний протективний ефект, більш інтенсивний, ніж такий у тиотриазоліну, застосованого ізольовано. Тиотриазолін у концентраціях 0.001–0.1 мг/мл не справляв значної негативної дії на досліджувану культуру клітин нейробластоми.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. T. W. Clarkson, L. Magos, "The toxicology of mercury and its chemical compounds," *Crit. Rev. Toxicol.*, **36**, 609-662 (2006).
2. J. G. Dórea, "Low-dose mercury exposure in early life:

- Relevance of thimerosal to fetuses, newborns and infants,” *Current Med. Chem.*, **20**, 4060-4069 (2013).
3. R. F. Kamynsky, V. I. Primachenko, L. M. Sokurenko, et al., “A study of impact of mercury chloride on myocardium in experiment,” *Georg. Med. News*, **251**, 64-70 (2016).
 4. I. M. Trachtenberg, Yu. B. Chaikovsky, and L. M. Sokurenko, “Morphological views on mercury intoxication pathogenesis (Review of literature),” *Mod. Probl. Toxicol.*, **1**, 11-17 (2008).
 5. J. P. Rooney, “The role of thiols, dithiols, nutritional factors and interacting ligands in the toxicology of mercury,” *Toxicology*, **234**, 145-156 (2007).
 6. I. I. Fomochkin, V. V. Kazakova, P. N. Kolbasin “Clinical effectiveness of trental and thiotriazolium in the treatment of acute pancreatitis”, *Klin. Khirurg.*, **10**, 10-12 (1999).
 7. L. M. Sokurenko and Yu. B. Chaikovsky “Mildronate protects neuroblasts against toxic influence of mercuric chloride in cell culture,” *Neurophysiology*, **46**, No. 3, 271-273 (2014).
 8. I. Kalvinsh, *Mildronate: The Mechanisms of Action and Perspectives of Use*, Grindex, Riga (2002).
 9. N. Sjakste, A. Gutaitis, and I. Kalvinsh, “Mildronate: an antiischemic drug for neurological indications,” *CNS Drug Rev.*, **11**, 151-168 (2005).
 10. E. Liepinsh, R. Vilskersts, D. Loca, et al., “Mildronate, an inhibitor of carnitine biosynthesis, induces an increase in gamma-butyrobetaine contents and cardioprotection in isolated rat heart infarction,” *J. Cardiovascul. Pharmacol.*, **48**, 314-319 (2006).