

УДК: 611-018.84: 546.49'131:612.085.2

ИССЛЕДОВАНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ НЕЙРОГЛИИ К ХЛОРИДУ РТУТИ IN VITRO

Л. М. Сокурченко¹, Ю. Б. Чайковский¹, Ю. И. Кудрявец²

1 – Национальный медицинский университет имени А. А. Богомольца, Украина

2 – Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии имени Р. Е. Кавецкого НАН Украины, Украина

Культура клеток является альтернативной методикой для выяснения механизмов действия разных токсикантов таких, например, как тяжелые металлы. Цитотоксическое действие хлорида ртути изучалось на культурах клеток U-373 (глиобластома человека). В диапазоне концентраций от 1000 до 0,1 мкМ/мл. Наиболее токсичные эффекты хлорид ртути проявляет на культуру нейроглии U-373 в дозах 1000 и 100 мкМ/мл, а наименьшие проявления наблюдаются при дозах 1 и 0,1 мкМ/мл.

Ключевые слова: интоксикация, хлорид ртути, микромеркуриализм, культура клеток, нервная ткань, нейроглия.

The cells culture is an alternative method for the deflection of different action mechanisms of toxicology agents, such as heavy metals. Cytotoxicology action of mercury chloride was studied on the cultures of cells U-373 (human glioblastoma). In the range of concentrations from 1000 to 0,1 мкМ/мл of the mercury chloride shows the most toxic effects on the culture of neuroglia in doses of 1000 and 100 мкМ/мл, and the least displays are observed at doses of 1 and 0,1 мкМ/мл.

Key words: intoxication, chloride of mercury, mycomercurialism, cell culture, nervous tissue, neuroglia.

На фоне ежегодного возрастания загрязнения окружающей среды и, соответственно, увеличения воздействия на организм человека химических веществ (токсикантов) возникает потребность в углубленном изучении их механизмов действия. В связи с этим постоянно увеличивается потребность в исследуемых животных, что требует материальных затрат, а защитники животных подвергают все большей критике использование животных в экспериментах [1]. Альтернативным методом для выяснения механизмов действия токсикантов, в частности, ртуть является культура клеток [2, 3].

Цель исследования – изучение цитотоксического действия ртути на нейроглию.

Материалы и методы исследования

Цитотоксическое действие хлорида ртути изучалось методом двукратных серийных разведений на перепрививаемых культурах клеток U-373 (глиобластома человека). Чувствительность клеток к действию хлорида ртути изучали при окраске клеток трипановым синим, подсчет клеток осуществляли с помощью гемоцитометра. Определяли: проценты живых и мертвых клеток нейроглии в эксперименте, индексы цитопатических изменений по мертвым и живым клеткам нейроглии, индексы пролиферации по мертвым, живым и общему количеству клеток. Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета статистических программ «Statistica 4.0» (Statistica Inc. USA), «Biostat» и MS Excell. Отличия между опытами устанавливали использованием непараметрического критерия Манна-Утти-Вилкоксона. Достоверными считали отличия с уровнем значимости более 95% ($p < 0,05$).

Результаты исследований

При исследовании нейроглии линий U-373 на ранних сроках (24 часа), наблюдали полное отсутствие живых клеток при дозах 1000 и 100 мкМ/мл. В то же время, при 10 мкМ/мл в культуре нейроглии достоверно увеличивается количество живых клеток до 68,0 (55,0; 80,1; $n=4$) %, которое достоверно меньше, чем в контроле. При дозе 1 мкМ/мл этот показатель равняется 90,9 (86,4; 95,5; $n=4$) %, что статистически достоверно больше, чем при предыдущей дозе, хотя и статистически значимо меньше, чем в эксперименте без влияния соли ртути. При концентрации 0,1 мкМ/мл в этом же сроке процент живых клеток достоверно увеличивается сравнительно с опытом при дозе 1 мкМ/мл, достигая значений контроля, 98,1 (96,2; 100; $n=4$)%.

Индекс цитопатических изменений по мертвым клеткам нейроглии на ранних сроках исследований при дозах 1000 и 100 мкМ/мл достоверно больше нормы в 50 раз (50,0 (50; 50; $n=4$)). В то время как по живым клеткам для этих доз равняется 0,0 (0; 0; $n=4$). При концентрации 10 мкМ/мл соотношение мертвых клеток к таким в контроле достоверно уменьшается (16,0 (9,5; 22,5; $n=4$)), но статистически значимо больше нормального в 16 раз. Соотношение живых клеток к таким в контроле достоверно увеличивается относительно исследования с предыдущей дозой 0,69 (0,56; 0,82; $n=4$) и достоверно меньше контрольного показателя. В дозе 1 мкМ/мл индекс цитопатических изменений по мертвым клеткам постепенно достоверно уменьшается до 4,5 (2,3; 6,8; $n=4$), а по живым увеличивается до 0,93 (0,88; 0,97; $n=4$), хотя статистические отличия с контролем еще сохраняются. В опыте с кон-

центрацией 0,1 мкМ/мл хлорида ртути оба показателя достоверно растут по отношению к исследованию с большей дозой и приближаются к норме, 1,00 (0; 1,9; n=4) и 1,00 (0,98; 1,0; n=4).

Индексы пролиферации нейроглии на 24 час наблюдения при дозе 1000 мкМ/мл статистически достоверно ниже контрольных: по всем клеткам и мертвым 0,6 (0,56; 0,64; n=4), а по живым клеткам равны нулю 0,0 (0; 0; n=4). Индексы пролиферации при дозе 100 мкМ/мл имеют такие же тенденции, как и при предыдущей дозе: 0,64 (0,56; 0,71; n=4), 0,64 (0,56; 0,71; n=4) и 0,0 (0; 0; n=4), соответственно. При концентрации 10 мкМ/мл индекс пролиферации по всем клеткам (0,77 (0,75; 0,79; n=4)) и индекс пролиферации по живым клеткам (0,5 (0,42; 0,44; n=4)) достоверно возрастают сравнительно с предыдущим опытом, хотя и остаются статистически значимо меньше нормальных показателей. Индекс по мертвым клеткам (0,25 (0,15; 0,34; n=4)) достоверно уменьшается, относительно опыта с дозой 100 мкМ/мл, но остается больше контроля. Индексы пролиферации по всем клеткам и по живым клеткам в опыте с использованием дозы 1 мкМ/мл достоверно меньше нормы, но имеют статистически значимые отличия, сравнительно с показателями предыдущей дозы и равны 0,83 (0,83; 0,83; n=4) и 0,8 (0,71; 0,79; n=4), соответственно. Индекс пролиферации по мертвым клеткам (0,1 (0,04; 0,11; n=4)) также увеличивается относительно показателя в большей дозе и приближается к значениям контроля. Значение в опыте исследований раствора 0,1 мкМ/мл хлорида ртути отображают статистические отличия от показателей пролиферации предыдущих концентраций и составляют 0,92 (0,9; 0,98; n=4) для всех клеток, 0,02 (0; 0,04; n=4) для живых и 0,9 (0,9; 0,94; n=4) для мертвых, сравниваясь с величинами контроля.

В исследовании доз 1000 и 100 мкМ/мл на поздних сроках (48 часов), так же, как и на ранних, наблюдается полное отсутствие живых клеток. А при 10 мкМ/мл в культуре нейроглии достоверно увеличивается количество живых клеток до 76,9 (69,2; 84,6; n=4)%, что статистически меньше контрольного показателя и значения в предыдущем сроке. В дозе 1 мкМ/мл этот параметр равняется 81,6 (77,4; 85,7; n=4) %, что больше, чем в предыдущей опыте, хотя все же достоверно меньше, чем в эксперименте без влияния соли ртути и опыте на 24 часа. При концентрации 0,1 мкМ/мл процент живых клеток достоверно увеличивается сравнительно с исследованием дозы 1 мкМ/мл (93,2 (92,3; 94,2; n=4)%), достигая значений контроля, хотя и меньше, чем в предыдущем сроке.

Индекс цитопатических изменений по мертвым клеткам линии U-373 на поздних сроках опыта влияния 1000 и 100 мкМ/мл хлорида ртути достоверно больше такого в норме в 23 раза (22,9 (22; 22; n=4)), и статистически значимо меньше, чем в предыдущем сроке, что может трактоваться, как раз-

рушение погибших клеток. Это подтверждает величина индекса цитопатических изменений по живым клеткам для этих доз, которая равняется 0,0 (0; 0; n=4). При концентрации 10 мкМ/мл соотношения мертвых клеток к таким же в контроле сравнительно с показателем в больших дозах и в предыдущем сроке достоверно уменьшается до 5,3 (3,5; 7,0; n=4), что, однако, статистически значимо больше нормального в 5 раз. Соотношение живых клеток к таким в контроле аналогично ранним срокам достоверно увеличивается, относительно опыта с предыдущей дозой 0,8 (0,7; 0,9; n=4), хотя и статистически значимо меньше контрольного показателя. В дозе 1 мкМ/мл индекс цитопатических изменений по мертвым клеткам незначительно уменьшается, относительно других опытов сравнения (4,2 (3,3; 5,1; n=4)), а по живым увеличивается до 0,85 (0,8; 0,9; n=4), хотя статистические отличия с контролем в обоих показателях еще сохраняются. В исследовании с дозой 0,1 мкМ/мл хлорида ртути оба показателя статистически значимо изменяются относительно дозы 1 мкМ/мл и приближаются к норме, 1,6 (1,3; 1,8; n=4) и 0,98 (0,97; 0,98; n=4).

Индексы пролиферации культуры U-373 на 48 час наблюдения при концентрации хлорида ртути 1000 мкМ/мл равняются по всем и мертвым клеткам 0,6 (0,57; 0,63; n=4). А по живым клеткам – 0,0 (0; 0; n=4), что достоверно отличается от контроля. Индексы пролиферации при дозе 100 мкМ/мл отличаются от нормы аналогично предыдущей дозе, и равняются 0,59 (0,55; 0,63; n=4), 0,6 (0,55; 0,63; n=4) и 0,0 (0; 0; n=4), соответственно, а также не имеют существенных отличий от значений ранних сроков. При концентрации 10 мкМ/мл индексы пролиферации также аналогичны опыту на 24 часа: индекс по всем (0,75 (0,75; 0,75; n=4)) и по живым клеткам (0,6 (0,52; 0,6; n=4)) достоверно возрастает, сравнительно с предыдущим опытом, хотя оба остаются достоверно меньше нормальных показателей. Индекс пролиферации по мертвым клеткам (0,2 (0,11; 0,23; n=4)) статистически достоверно уменьшается, относительно опыта с дозой 100 мкМ/мл, оставаясь больше контроля. В опыте с использованием дозы 1 мкМ/мл индекс пролиферации по всем клеткам (0,95 (0,89; 1,0; n=4)) приближается к норме, достоверно возрастая, в отличие от показателя предыдущих дозы и срока. А по живым клеткам (0,8 (0,7; 0,86; n=4)), хотя и статистически достоверно меньше нормы, но имеют статистически значимые отличия, сравнительно с показателями большей концентрации, аналогично величине на раннем сроке исследования. Индекс пролиферации по мертвым клеткам (0,2 (0,14; 0,2; n=4)), аналогично дозе 1 мкМ/мл приближается к значениям контроля и достоверно больше, чем в исследовании на сроке 24 часа. Значения исследования раствора хлорида ртути 0,1 мкМ/мл приближаются к величинам контроля, и отображают ста-

тистические отличия от показателей пролиферации предыдущей дозы и составляют для живых 1,0 (0,93; 1,0; n=4) и для мертвых 0,1 (0,06; 0,09; n=4). Последний и показатель для всех клеток (1,06 (0,98; 1,1; n=4)) достоверно возрастают относительно предыдущего срока.

Обсуждение

При исследовании нейроглии под действием сулемы в дозах 1000 и 100 мкМ/мл наблюдается полное отсутствие живых клеток. Индекс цитопатических изменений по мертвым клеткам нейроглии достоверно больше такого при норме в несколько десятков раз. Индексы пролиферации по всем клеткам и мертвым статистически достоверно ниже контрольного, а по живым клеткам равняется нулю. При 10 мкМ/мл в культуре нейроглии достоверно увеличивается количество живых клеток, что достоверно меньше, чем в контроле и на раннем сроке. Соотношения мертвых клеток к таким в контроле достоверно уменьшается, однако статистически значимо больше нормального в несколько раз, а соотношение живых клеток к таким в контроле достоверно увеличивается относительно опыта с предыдущей дозой, хотя и статистически значимо меньше контрольного показателя. Индекс пролиферации по всем клеткам, как и индекс пролиферации по живым, достоверно растут, сравнительно с предыдущей дозой, хотя и остаются достоверно меньше нормальных показателей, а по мертвым статистически достоверно уменьшается, относительно опыта с дозой 100 мкМ/мл, оставаясь больше контроля. При концентрации 1 мкМ/мл количество живых клеток статистически достоверно больше, чем при предыдущей дозе, хотя и достоверно меньше, чем в эксперименте без влияния соли ртути. Индекс цитопатических изменений по мертвым клеткам постепенно достоверно уменьшается, относительно других опытов сравнения, а по живым увеличивается, хотя статистические отличия с контролем еще сохраняются. Индексы пролиферации по всем клеткам и по живым достоверно меньше нормы, но имеют статистически значимые отличия, сравнительно с показателями преды-

дущей дозы. Индекс пролиферации по мертвым клеткам уменьшается, относительно показателя в большей дозе, и приближается к значениям контроля. При концентрации 0,1 мкМ/мл процент живых клеток достоверно увеличивается, сравнительно с исследованием дозы 1 мкМ/мл, достигая значений контроля. Индексы цитопатических изменений достоверно по мертвым уменьшаются и живым клеткам растут, по отношению к опыту с большей дозой, и приближаются к нормальным. Индексы пролиферации отображают статистическое уменьшение по мертвым и рост по всем и живым клеткам. В отличие от показателей предыдущей дозы, они сравниваются с величинами контроля.

Таким образом, в диапазоне концентраций от 1000 до 0,1 мкМ/мл. наиболее токсичные эффекты хлорид ртути проявляет на культуру нейроглии U-373 в дозах 1000 и 100 мкМ/мл, а наименьшие — при дозах 1 и 0,1 мкМ/мл.

Выводы

1. Культура нейроглии U-373 проявляет высокую чувствительность к токсичному действию соединений ртути.

2. Наиболее токсичные эффекты хлорид ртути проявляет на культуру нейроглии U-373 в дозах 1000 и 100 мкМ/мл, а наименьшие проявления наблюдаются при дозах 1 и 0,1 мкМ/мл.

В последующих исследованиях будет проведено изучение протекторного влияния антиоксидантов на культуру нейронов U-373 в условиях токсичного действия хлорида ртути.

Литература

1. Дейнека С.Э. Токсиколого-гігієнічні аспекти застосування методу культури клітин при комплексному вивченні сполук металів та оцінці засобів цитопротекції. // Автореф. дис. ... докт. мед. наук. — К., 2000. — 33 с.
2. Хейли Бойд Э. Токсичность ртути: генетическая предрасположенность и синергические эффекты // Medical Veritas. - 2005. - № 9. - P. 535-542.
3. Kaur P. Glutathione modulation influences methyl mercury induced neurotoxicity in primary cell cultures of neurons and astrocytes / Kaur P., Aschner M., Syversen T. // NeuroToxicology. - Vol. 27, № 4. - P. 492-500.

Поступила 09.04.09