

ЦИТОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ АНТИГИПОКСИЧЕСКИХ И АНТИОКСИДАНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА В КУЛЬТУРЕ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ТОКСИЧЕСКОГО ОТВЕТА

М.Ю.ЕРОПКИН, Т.Д.СМИРНОВА, Е.М.ЕРОПКИНА*, Е.Г.МАМАЕВА*.

НИИ гриппа РАМН, С. Петербург,

*НИИ травматологии и ортопедии им. Р.Р.Вредена, С. Петербург,
факс: (812) 234-59-73

Окислительный стресс рассматривается как один из важных механизмов цитотоксичности. Целью работы было исследование действия ряда препаратов с антиоксидантной/антигипоксической активностью на вызванный антисептиками цитотоксический ответ фибробластов легкого эмбриона человека в культуре. Исследовали следующие препараты: мафусол (фумарат), человеческую эритроцитарную супероксиддисмутазу (СОД), цитохром с, α -токоферол и тиоктацид (липоат) в концентрациях, соизмеримых с применяемыми в клинике, а также комбинации этих препаратов. Цитотоксический ответ вызывали введением в среду инкубации клеток на 2-24 час катионного(полисепт) или анионного (ДДС) антисептиков в 2-5 кратных разведениях до минимальных токсических доз. Испытываемые препараты вводили одновременно с антисептиками.

Максимальный цитопротекторный эффект обнаружен в случае комбинации фумарата и витамина Е, на втором месте стоит комбинация фумарата с СОД. При введении отдельных препаратов наибольшим эффектом обладал фумарат, далее следовали витамин Е и цитохром с. СОД и липоат в данных условиях не проявляли цитопротекторного действия при изолированном введении.

Использованная модель цитотоксичности *in vitro* может служить удобной тест-системой в скрининге цитопротекторных препаратов и их комбинаций.

Ключевые слова: цитотоксичность, культура клеток, антигипоксанты, антиоксиданты, цитопротекторный эффект.

ВВЕДЕНИЕ. Одним из наиболее важных механизмов цитотоксичности считается окислительный стресс [1,2], в процессе которого развивается тканевая гипоксия и генерируются активные формы кислорода [3-5].

Токсичность на клеточном уровне чаще всего связана с повреждением жизненно важных неспецифических функций, таких как проницаемость клеточных мембран, дыхательных ферментов митохондрий, перенапряжением антиоксидантных систем и т.д. Это находит отражение в так называемом "базовом" (неспецифическом) механизме токсичности, а именно: цитотоксический ответ выражается в последовательности однотипных неспецифических реакций, не зависящих ни от конкретной структуры токсиканта, ни от тканевого и видового происхождения клеток [6-8].

Ранее нами продемонстрировано, что антисептики различной химической природы, катионные белки и ряд других химических соединений вызывают в клетках человека в культуре однотипный цитотоксический ответ, выражающийся в

выходе в среду инкубации лактатдегидрогеназы (ЛДГ), повышении уровня индуцированного перекисного окисления липидов (ПОЛ) и модуляции активности ряда ферментов, связанных с антиоксидантной системой клетки и обменом глутатиона [9-11].

Целью настоящей работы было исследовать действие широко применяющихся в клинике препаратов с антигипоксическим и/или антиоксидантным эффектом - фумарата, супероксиддисмутазы (СОД), цитохрома с, α -токоферола и липоата или их сочетаний на вызванный антисептиками цитотоксический ответ клеток человека в культуре.

МЕТОДИКА. *Культура клеток.* В работе использована культура диплоидных фибробластов легкого эмбриона человека (авторская линия НИИ гриппа РАМН). Клетки рассевали в 12-ти луночные пластиковые культуральные планшеты фирмы Linbro (США) в посевной концентрации 250.000 клеток/мл и подращивали 2 суток до образования конфлуэнтного монослоя. Для культивирования использовали среду Игла-МЕМ с добавлением 10 % сыворотки крупного рогатого скота ("Биолот", С.Петербург).

Модель цитотоксичности in vitro. Цитотоксический ответ индуцировали введением в среду инкубации полимерного катионного антисептика полисепта (полигексаметиленгуанидин, "Фарма-130", Владимирская обл.) или анионного поверхностно-активного вещества с антисептической активностью - додецилсульфата Na (ДДС, "Serva", ФРГ) на 24 час в ростовой среде или на 2 час в поддерживающей среде Хэнкса. Препараты вводили в 2-5 кратных разведениях вплоть до минимальных острых токсических доз, установленных в ходе ранее проведенных исследований [9-11].

В качестве критериев токсического действия использовали следующие тесты:

1) Восстановление клетками красителя нитросинего тетразолия (НСТ) [12] - широко используемый экспресс-метод оценки острой токсичности *in vitro* [7, 8]. После тщательной отмывки клетки инкубировали 3 час с 0,5 % раствором НСТ в среде Хэнкса при 37°C; образовавшийся осадок диформазана экстрагировали диметилсульфоксидом и измеряли оптическую плотность при 550 нм. Результат выражали в % от контрольных проб.

2) Выход в среду инкубации клеток цитоплазматической ЛДГ.

Активность фермента измеряли, отбирая аликвоты среды инкубации по методу [13], оценивая кинетику NADH-зависимого восстановления пирувата в лактат. Результаты выражали в нмолях NADH в мин на мл среды инкубации клеток.

3) Fe^{2+} -индуцированное перекисное окисление липидов.

После отмывки клеток раствором Хэнкса их инкубировали 2 час с Fe^{2+} в конечной концентрации 1мМ. Конечные продукты ПОЛ определяли непосредственно в среде инкубации по реакции с ТБК [14]. Результаты выражены в нмолях МДА на мл среды инкубации.

Использованные препараты. Все исследованные препараты вводили одновременно с антисептиками в концентрациях, соизмеримых с применяемыми в клинике: исходили из расчетной концентрации препарата в крови при максимальной суточной дозе согласно инструкции к применению. Некоторые препараты (СОД, цитохром с и липоат) вводили также в повышенных в 2-2,5 раза концентрациях.

Мафусол (АО "Самсон", С.Петербург), представляющий собой раствор 0,1 М фумарата Na, 0,1 М NaCl, 4мМ KCl и 1,3 мМ MgCl_2 вводили из расчета 80 мкл на 1 мл среды инкубации. Человеческую эритроцитарную СОД производства НИИ особочистых биопрепаратов, С.Петербург, представляющую собой лиофильно высушенный препарат, вводили в конечной концентрации 3,2 и 8 мкг/мл. Цитохром с (АО "Самсон", С.Петербург) вводили в виде готового к употреблению раствора исходя из конечной концентрации фермента 4 и 8 мкг/мл. α -Токоферол ("Calbiochem", США) использовали в виде спиртового раствора объемом 5 мкл в

("Calbiochem", США) использовали в виде спиртового раствора объемом 5 мкл в конечной концентрации 25 мкМ. Тиоктацид Т (α -липоат, ASTA Medica, ФРГ), готовый к применению раствор, использовали в концентрации 10-20 мкл/мл, что соответствует конечной концентрации липоата 0,12-0,24 мг/мл. Кроме того, исследовали действие ряда сочетаний указанных препаратов, где они использовались в тех же концентрациях, что и при раздельном введении.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Инкубация клеток как с катионным (табл. 1), так и с анионным (табл. 2) антисептиками вызывала однотипный дозозависимый цитотоксический ответ, выражавшийся в: 1) уменьшении способности клеточного монослоя восстанавливать НСТ, что служит индикатором падения активности дыхательных ферментов митохондрий [12], и, следовательно, общего снижения жизнеспособности клеток; 2) выходе в среду инкубации ЛДГ, отражающем нарушение целостности цитоплазматической мембраны; 3) развитии Fe^{2+} -зависимого перекисного окисления липидов, что свидетельствует об истощении антиокислительных ресурсов клеток.

Неспецифичность цитотоксического ответа на ксенобиотики разной химической природы, наблюдавшаяся в наших опытах, согласуется с предположением о достаточно универсальном характере токсического ответа на клеточном уровне (гипотеза "базовой токсичности") [6-8].

При рассмотрении действия на клетки в культуре ДДС (табл. 2) обращает на себя внимание, что концентрация препарата 12,5 мкг/мл (≈ 43 мкМ), установленная в наших предыдущих опытах как минимальная эффективная доза в данных условиях, вызывала повышение активности клеточных дыхательных ферментов по сравнению с контролем без ксенобиотика. Аналогичное действие минимальных эффективных доз токсических препаратов по другим показателям клеточного метаболизма отмечено нами ранее [9-11], совпадает с рядом данных литературы [15] и, вероятно, также является одной из общих черт проявления ранней стадии цитотоксичности, которую можно трактовать как фазу мобилизации стресса на клеточном уровне.

Ростовая питательная среда содержит сыворотку крови, которая обладает собственной высокой активностью ЛДГ и антиоксидантным потенциалом, что не позволяет оценивать токсичность по данным критериям при использовании ростовой среды. Жизнеспособность клеток при инкубации 24 час с полисептом в ростовой среде по тесту восстановления НСТ мало отличалась от таковой при 2 час инкубации с препаратом в поддерживающем солевом растворе Хэнкса, что позволило нам перейти в дальнейших опытах к использованию только поддерживающей среды и короткого срока экспозиции с ксенобиотиками (табл. 1).

Действие препаратов мафусола и СОД оценивалось на фоне нескольких концентраций полисепта и ДДС (табл. 1 и 2), действие остальных исследованных препаратов - на фоне одной концентрации полисепта, оказывавшей умеренное токсическое действие (ингибирование восстановления НСТ примерно на 30 % по сравнению с контролем).

Результаты табл. 1-3 показывают, что под действием мафусола наблюдается тенденция к улучшению состояния клеток по показателям теста восстановления НСТ и активности ЛДГ почти при всех концентрациях ксенобиотиков, хотя не везде эта тенденция достоверна. Хорошо проявил себя α -токоферол, полностью блокируя индуцированное ПОЛ и достоверно улучшая состояние клеток в двух других использованных тестах. Цитохром с достоверно повышал жизнеспособность клеток лишь по тесту восстановления НСТ. СОД ингибировала Fe^{2+} -индуцированное ПОЛ при концентрации полисепта 5 мкг/мл и ДДС 50 мкг/мл, а также стимулировала восстановление клетками НСТ, хотя при концентрации фермента, повышенной в 2,5 раза по сравнению с рекомендованной для клинического применения. Тиоктацид не проявил достоверных эффектов ни по одному из показателей, хотя в целом отмечена тенденция, скорее, к ухудшению состояния клеток под действием данного препарата.

Наибольший положительный эффект проявило сочетанное введение в среду инкубации мафусола и α -токоферола, мафусола и СОД и, несколько меньше, мафусола и цитохрома с: первые два сочетания возвращали к нормальным значениям показатели восстановления НСТ при 5 мкг/мл полисепта, при этом первое сочетание вызвало даже стимулирующий эффект - превышение контроля.

Мафусол, препарат на основе фумарата, разработанный в НИИ гематологии и переливания крови, С.Петербург, широко используется в неотложной медицине как антигипоксикант [16,17]. При блокировании НАДН- дегидрогеназного участка дыхательной цепи в результате гипоксии, компенсаторным метаболическим путем образования АТФ может служить окисление сукцината. Однако введение самого сукцината малоэффективно в силу его плохой проницаемости через биологические мембраны [3]. При жесткой гипоксии в сукцинат может превращаться другой субстрат цикла Кребса - фумарат, вследствие обращения в такой ситуации терминальных реакций цикла [4,17].

α -Токоферол является одним из наиболее эффективных неферментативных антиоксидантов [18], поэтому неудивительно, что он полностью блокировал Fe^{2+} -индуцированное ПОЛ в клеточной культуре (табл. 3). Сочетание этого препарата с мафусолом оказалось самым эффективным по своему цитопротекторному действию.

Несколько удивляет отсутствие выраженного защитного эффекта на нашей модели у СОД, применение которой оправдало себя в клинике при целом ряде заболеваний, связанных со свободнорадикальной патологией [19]. Однако сочетание СОД + мафусол оказалось на втором месте по эффективности после мафусол + α -токоферол. Цитохром с обладает выраженной пероксидазной активностью [4], что обуславливает его антиоксидантные и антигипоксические свойства. На нашей модели защитное действие цитохрома с выявлялось только по тесту восстановления НСТ, при этом его совместное введение с мафусолом несколько стабилизировало клеточные мембраны (тест по утечке в среду инкубации ЛДГ).

Препараты липоевой кислоты также применяются в качестве антиоксидантов и цитопротекторов [20], однако исследованный нами тиоктацид Т оказался неэффективен и даже несколько обострял цитотоксическое действие по двум критериям: тетразолиевому тесту и активности ЛДГ в среде инкубации, хотя этот эффект не был достоверным.

Таким образом, использованная модель цитотоксичности *in vitro* может быть удобной тест-системой в скрининге цитопротекторных препаратов и их комбинаций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Brogaard B. (1997). *Altern. Lab. Animals*, **25**, 279-287.
2. Garcia-Alfonso C., Repetto G., Sanz P., Repetto M., Lopez-Barea J. (1998). *Altern. Lab. Animals* **26**, 321-330.
3. Лукьянова Л.Д. (1997). *Бюлл. эксп. биол. мед.*, **124**, 244-254.
4. Лукьянчук В.Д., Савченкова Л.В. (1998). *Экспер. клинич. фармакол.*, **61**, 72-79.
5. Ляпков Б.Г., Ткачук Е.Н. (1995). *Вопр. мед. химии*, **41**, 2-8.
6. Balls M., Fentem J.H. (1992). *Altern. Lab. Animals*, **20**, 368-389.
7. Clemedson C., McFarlane-Abdulla E., Andersson M. et al. (1996). *Altern. Lab. Animals* **24**, Suppl. 1 - 251-311.
8. Clemedson C., Barile F.A., Ekwall B. (1998). *Altern. Lab. Animals*, **26**, Suppl. 1, 93-183.
9. Еропкин М.Ю., Афиногенов Г.Е., Еропкина Е.М. (1995). *Вопр. мед. химии*, **41**, 36-40.

10. Еропкина Е.М., Афиногенов Г.Е., Еропкин М.Ю. (1997). Токсикол. вестник 2, 12-17.
11. Еропкин М.Ю., Еропкина Е.М. (1997). Токсикол. вестник, № 5, 26-31.
12. Mosmann T. (1983). J. Immunol. Meth., 65, 55-63.
13. Ещенко Н.Д. (1982). Методы биохимических исследований. М.И.Прохорова. Л. 222-226.
14. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. (1977). Современные методы в биохимии (ред. В.Н.Орехович), М., 66-68.
15. Slamon N.D., Pentreath V.W. (1998). Altern. Lab. Animals, 26, 303-319.
16. Селиванов Е.А. (1992). Тезисы докл. I Российского нац. конгресса "Человек и лекарство". М. 418.
17. Смирнов А.В., Криворучко Б.И. (1998). Анестезиол. реаниматол., № 2, 50-55.
18. Chow C.K. (1991). Free Rad. Biol. Med., 11, 215-232.
19. Бекманн Р., Флое Л. (1987). Медицина: компакт-информация для Вашей практики. Приложение 1. - Аахен, фирма Грюненталь. - 1-30.
20. Sumathi R., Jayanthi S., Kalpanadeli V. (1993). Pharm. Res., 27, 309-318.

Поступила 17. 02. 99.

CYTOPROTECTIVE ACTION OF ANTIHYPOXIC AND ANTIOXIDANT PREPARATIONS IN HUMAN CULTURED CELLS UNDER CONDITIONS OF PROVOKED CYTOTOXIC RESPONSE

M. YU. EROPKIN, T.D.SMIRNOVA, E.M.EROPKINA* , E.G.MAMAEVA*

Institute of Influenza, Russian Medical Academy, St.Petersburg, *R.R.Vreden Institute of Traumatology and Orthopedics, St.Petersburg.
fax: (812) 234-59-73.

An oxidative stress is considered to be one of the major mechanisms of cytotoxicity. The purpose of present work was to study effects of some drugs with antihypoxic/antioxidant activity in cultured human lung embryonic fibroblasts under conditions of cytotoxic response, provoked by cationic or anionic antiseptics. The following preparations were under study: Mafusol (Na-fumarate), superoxide dismutase from human erythrocytes (SOD), cytochrome *c*, α -tocopherol and Thiocitacid T (lipoate) which were applied at concentrations comparable with those, employed in clinical application. The combinations of the used drugs were also under study. The cytotoxic response was induced by an application of antiseptics into the cell incubation medium in 2-5 fold dilutions up to minimum toxic doses for 2-24 h. The drugs under study were introduced simultaneously with antiseptics.

The maximum cytoprotective effect was revealed in the case of combination fumarate- α -tocopherol; the combination fumarate plus SOD being the second in effectiveness. When the drugs were introduced separately, the most effective proved to be fumarate, followed by vitamin E and cytochrome *c*. SOD and lipoate did not reveal any cytoprotective activity in our experimental conditions.

The designed model of cytotoxicity *in vitro* can be considered as a prospective test-system for the screening of cytoprotective drugs and their combinations.

Key words: cytotoxicity, cell culture, antihypoxants, antioxidants, cytoprotective effect.