

УДК: 615.015.35

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ КОМБИНИРОВАННОЙ ТОКСИЧНОСТИ СВИНЦА И МЕДИ НА КУЛЬТУРЕ НЕЙРОНАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Шабардина Лада Владимировна, Килина Екатерина Алексеевна, Минигалиева Ильзира Амировна, Бушуева Татьяна Викторовна

ФБУН «Екатеринбургский медицинский научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Екатеринбург, Россия

Аннотация

Введение. Воздействие свинца (Pb) или меди (Cu) связано с повышенным риском повреждения клеток и тканей нервной системы. Анализ соотношений доза-эффект, изучаемых токсических элементов, имеет практическое значение как с точки зрения оценки и управления рисками для здоровья работников металлургических предприятий, так и для выбора диапазона доз в экспериментальной токсикологии. Вместе с тем, эффекты при комбинированном воздействии, могут отличаться от эффектов изолированного. **Цель исследования** - изучение особенностей комбинированного действия Pb и Cu на клетки IMR-3. **Материал и методы.** На клетки линии нейробластомы человека (IMR-32) воздействовали в течение 24 часов ацетатом свинца $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ и медью сернокислой $(\text{CuSO}_4) \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в различных концентрациях, как изолированно, так и в комбинации. В качестве контроля использовались клетки без воздействия. Цитотоксичность оценивали по показателю дегидрогеназной активности (MTT-тест). Математическое описание (моделирование) бинарной комбинированной токсичности осуществлялось с помощью Response Surface Methodology (RSM). **Результаты.** Снижение дегидрогеназной активности в клетках IMR-32 при изолированном воздействии Cu выявлено при экспозиции к 2,5 мкг/мл, а Pb – к 25 мкг/мл; тип комбинированной токсичности меняется с увеличением дозы: при экспозиции к низким дозам Cu и Pb выявлена «аддитивность», к высоким – «антагонизм». **Выводы.** Таким образом, тип комбинированного воздействия Cu и Pb на культуру клеток IMR-32 зависит от дозы.

Ключевые слова: нейротоксичность, комбинированная токсичность, культура клеток IMR-32, MTT-тест.

EXPERIMENTAL STUDY OF COMBINED TOXICITY OF LEAD AND COPPER IN HUMAN NEURONAL CELL CULTURE

Shabardina Lada Vladimirovna, Kilina Ekaterina Alekseevna, Minigalieva Ilzira Amirovna, Bushueva Tatyana Viktorovna

Yekaterinburg Medical Research Center for Prophylaxis and Health Protection in Industrial Workers
Yekaterinburg, Russia

Abstract

Introduction. Exposure to lead (Pb) or copper (Cu) is associated with an increased risk of damage to cells and tissues of the nervous system. The analysis of dose-effect relationships, of the toxic elements under study, is of practical importance both in terms of assessment and management of health risks to workers in copper smelters and for the selection of dose ranges in experimental toxicology. At the same time, the effects of combined exposure may differ from those of isolated exposure. **The aim of the study** was to investigate the peculiarities of combined action of Pb and Cu on IMR-3 cells. **Material and methods.** Human neuroblastoma cells (IMR-32) were exposed for 24 hours to lead acetate $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ and copper sulfate $(\text{CuSO}_4) \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ in different concentrations, both in isolation and in combination. Cells without exposure were used as control. Cytotoxicity was evaluated by the dehydrogenase activity index (MTT-test). Mathematical description (modelling) of binary combined toxicity was performed using Response Surface Methodology (RSM). **Results.** Decrease of dehydrogenase activity in IMR-32 cells at isolated exposure to Cu was detected at exposure to 2.5 µg/ml, and Pb - to 25 µg/ml; the type of combined toxicity changes with increasing dose: at exposure to low doses of Cu and Pb 'additivity' was detected, to high doses - 'antagonism'. **Conclusions.** Thus, the type of combined effect of Cu and Pb on IMR-32 cell culture is dose-dependent.

Keywords: neurotoxicity, combined toxicity, IMR-32 cell culture, MTT-test.

ВВЕДЕНИЕ

Медь и свинец распространенные загрязнители, присутствующие в воздухе рабочих помещений металлургических предприятий. Cu является микроэлементом, который имеет важные физиологические функции в нервной системе. В тоже время, дисбаланс Cu в организме приводит к активации механизмов, связанных с оксидативным стрессом,

ингибированием протеасом и дисфункцией митохондрий в клетках, а ее избыток часто связывают с нейродегенеративными заболеваниями [1, 2]. Рb относят к нейротоксическим агентам, который депонируется не только в костях, зубах и печени, но и в тканях головного мозга. Согласно литературным данным, период полураспада Рb в мозге составляет 2-3 года, тогда как в крови не превышает 30 дней [3]. Проникновению через гематоэнцефалический барьер способствует способность Рb замещать ионы кальция в клетках [3].

Большинство опубликованных экспериментальных работ, как правило, направлены на изучение изолированного воздействия Cu и Рb в то время, как реальные условия трудового процесса на медеплавильных предприятиях сопряжены с воздействием аэрозолей сложного состава. В связи с этим оценка комбинированной токсичности по отношению к различным тканям и органам является наиболее актуальной.

Цель исследования - изучение особенностей комбинированного действия Рb и Cu на клетки IMR-3.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперимент был проведен на клетках линии IMR-32 (нейробластома), полученных из коллекции Института цитологии РАН (г. Санкт-Петербург). Перед экспозицией клетки высаживались в 96-луночный планшет (TPP, Швейцария) по 30000 на 1 лунку, в объеме 100 мкл питательной среды. Планшеты с клетками инкубировали в атмосфере 5% CO₂ при 37°C в течение 24 часов, после чего питательную среду в лунках заменяли на среду, содержащую соли металлов (ацетат свинца – Pb(CH₃COO)₂*H₂O и меди сернокислой – (CuSO₄) *5H₂O) в следующих концентрациях (не менее трех на каждую концентрацию):

Pb(CH₃COO)₂*H₂O 25 мкг/мл;

Pb(CH₃COO)₂*H₂O 50 мкг/мл;

CuSO₄*5H₂O 2,5 мкг/мл;

CuSO₄*5H₂O 5 мкг/мл;

Pb(CH₃COO)₂*H₂O (50 мкг/мл) + CuSO₄*5H₂O (5 мкг/мл);

Pb(CH₃COO)₂*H₂O (50 мкг/мл) + CuSO₄*5H₂O (2,5 мкг/мл);

Pb(CH₃COO)₂*H₂O (25 мкг/мл) + CuSO₄*5H₂O (5 мкг/мл);

Pb(CH₃COO)₂*H₂O (25 мкг/мл) + CuSO₄*5H₂O (2,5 мкг/мл).

Планшеты с клетками инкубировали в атмосфере 5% CO₂ при 37°C в течение 24 часов. В качестве контрольных значений учитывали результаты МТТ-теста (показатель дегидрогеназной активности клеток) в лунках без добавления Рb и Cu, не менее, чем в трех дублях. МТТ-тест проводили с применением жёлтого тетразолиевого красителя (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид), восстанавливающегося в пурпурный формазан в живых клетках, который растворяли при добавлении диметилсульфоксида. В каждую лунку с клетками добавляли по 10 мкл МТТ красителя в концентрации 5 мг/мл и инкубировали в атмосфере 5% CO₂ при 37°C в течение 2 часов. После этого из планшетов полностью удаляли среду и в каждую лунку добавляли по 100 мкл диметилсульфоксида для растворения кристаллов формазана. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре Epoch™ (BioTek, США) при длине волны 490 нм.

Показатель МТТ-теста рассчитывали по формуле (1):

$$\text{Показатель МТТ (\%)} = \frac{100 * A_{490\text{нм}} \text{ опытный образец} - A_{490\text{нм}} \text{ blank}}{A_{490\text{нм}} \text{ контроль} - A_{490\text{нм}} \text{ blank}} \quad (1)$$

где A_{490нм} – оптическая плотность образца при длине волны 490 нм, blank – фоновая оптическая плотность культуральной среды.

Построение графиков и первичная обработка данных осуществлялась с использованием методов статистического анализа в пакетах прикладных программ MS Excel 2013. Статистическая значимость межгрупповых различий средних значений всех полученных показателей оценивалась с помощью t-критерия Стьюдента с поправкой на

множественные сравнения, различия считались статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Математическое описание (моделирование) бинарной комбинированной токсичности осуществлялось с помощью Response Surface Methodology (RSM).

Согласно этой методологии, уравнение (2), описывающее поверхность отклика $Y = Y(x_1, x_2)$, может быть построено подбором его коэффициентов к данным эксперимента:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 \quad (2)$$

где Y есть количественный эффект токсической экспозиции;

x_1 и x_2 - дозы веществ, входящих в комбинацию.

Математическая модель, представленная уравнением (2), позволяет предсказывать величину отклика Y для любой комбинации доз в пределах экспериментального диапазона фактических доз каждого фактора.

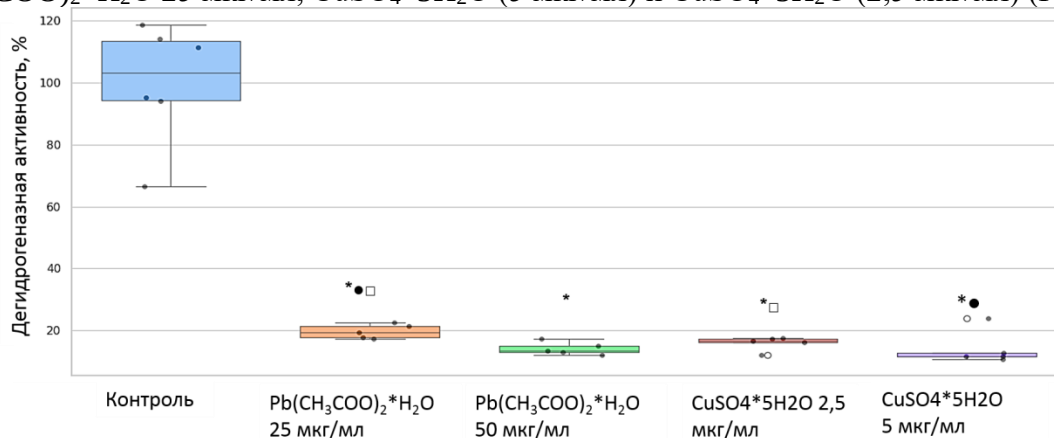
В данной работе была использована «гиперболическая модель» или «линейная модель с перекрестным членом» (все коэффициенты высокозначимы – $p\text{-value} \leq 10^{-6}$), построенная по уравнению (3):

$$Y = 79.1954 - 1.5015x_1 - 14.5418x_2 + 0.3573x_1x_2 \quad (3)$$

При применении методики поверхности отклика с перекрестным членом (гиперболический параболоид) возможно идентифицировать типологию. При этом вид совместного действия зависит от направления действия токсикантов и положения седловой точки гиперболического параболоида. Некоторые характеристики зависимости «доза-реакция» определяются как свойствами воздействующих вредных факторов, так и исходным состоянием живой системы.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ показателей МТТ-теста при оценке изолированной токсичности показал достоверное снижение значений по сравнению с контрольными значениями при экспозиции и к Pb, и к Cu, минимальные значения МТТ-теста по сравнению с контрольным образцом зафиксированы при экспозиции к 50 мг/мл $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, что характеризует максимальное снижение количества жизнеспособных клеток в культуре IMR-32. При анализе комбинированной токсичности выявлены более сложные типы взаимодействия изучаемых соединений в выбранных комбинациях. Так, при экспозиции к $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (25 мкг/мл) + $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (5 мкг/мл) и к $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (25 мкг/мл) + $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (2,5 мкг/мл) показатели МТТ-теста были достоверно выше, чем в образцах, экспонированных к $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 25 мкг/мл, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (5 мкг/мл) и $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (2,5 мкг/мл) (Рис.1).



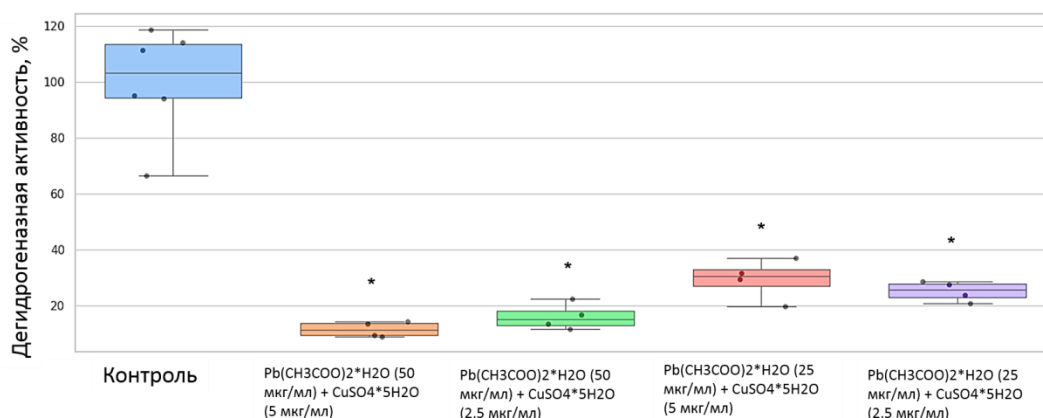


Рис. 1 Результаты МТТ-теста после воздействия $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ и $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ на культуру клеток IMR-32

Примечание: «*» - статистически значимое отличие от контроля; «●» - от комбинации 25+5; «□» - от комбинации 25+2,5 при $p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента

В результате применения гиперболической модели установлен тип комбинированного действия свинца и меди на дегидрогеназную активность в клетках нейробластомы IMR-32, представляющий собой классическую схему усиливающегося антагонизма с ростом концентраций токсикантов. При этом по симметрии кривых относительно биссектрисы $y = x$ можно сделать вывод о том, что подобранные дозировки Cu и Pb эквивалентны в отношении дегидрогеназной активности, т.е. пропорциональное изменение доз Cu и Pb приводит к примерно равным эффектам (рис. 2).

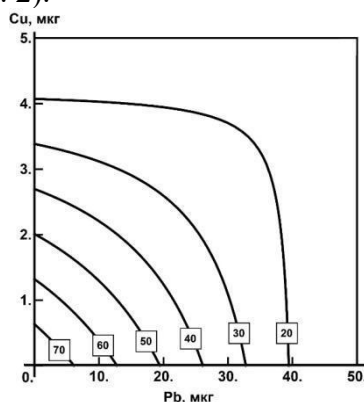


Рис. 2. Пример изоболограммы, характеризующей типологическое разнообразие комбинированной цитотоксичности $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ и $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, оцениваемой по одному и тому же эффекту (снижению дегидрогеназной активности в культуре клеток нейробластомы IMR-32)

При малых дозах Cu и Pb картина совместного действия вполне точно описывается термином «аддитивность», затем с ростом концентраций переходящая в антагонизм. При этом обращает на себя внимание всё большее выпрямление кривых, что означает: при больших дозах Cu и Pb (более 35 мкг для Pb и более 3,5 мкг для Cu) эффект антагонизма проявляется только при сопоставимых уровнях воздействия агентов. При значительном же превышении концентрации одного из агентов и нарушении описанной пропорциональности, совместное их действие определяется преимущественно тем соединением, чья концентрация возрастает.

ОБСУЖДЕНИЕ

По данным литературы, воздействие Pb или Cu связано с повышенным риском развития нейродегенеративных заболеваний. Однако комбинированное нейротоксическое воздействие этих элементов изучено недостаточно. Так, Di Wu и соавт. в эксперименте на клетках HT22 (нейроны гиппокампа мыши) показали усиление комбинированной токсичности Pb и Cu за счет усиления образования активных форм кислорода и малонового диальдегида, активности супероксиддисмутазы 1, повышения уровня апоптоза по сравнению с эффектами при изолированном воздействии [4]. Однако, с точностью доказано, что стимулирующий эффект на образование активных форм кислорода в клетках преимущественно оказывает Cu, являясь кофактором многочисленных антиоксидантных ферментов [5]. Продолжительность

эксперимента может влиять на результаты определения цитотоксичности [6]. В нашей работе «аддитивный» тип ответа был получен только при малых концентрациях, переходя в «антагонизм» при их повышении. С. Collom и соавт. показали, что поглощение Cu нейрональными клетками (SH-SY5Y) не зависело от ее концентрации в культуральной среде, в то время как поглощение Pb увеличивалось с повышением дозы, но при введении меди в культуру нейрональных клеток, содержащую свинец, поглощение свинца значительно снижалось [5]. Наблюдаемые цитотоксические реакции при комбинированном воздействии Cu и Pb все еще продолжают активно изучаться. Представленные результаты показывают, что токсикологические бинарные взаимодействия более сложны, чем принято считать, и необходимы дополнительные исследования, которые расширяют наше понимание общей теории комбинированной токсичности.

ВЫВОДЫ

1. Изолированное и комбинированное действие $Pb(CH_3COO)_2 \cdot H_2O$ и $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ оказывает токсический эффект на клетки IMR-32. Максимальное снижение жизнеспособности выявлено при воздействии $Pb(CH_3COO)_2 \cdot H_2O$ 50 мкг/мл.

2. Применение методики поверхности отклика с перекрестным членом (гиперболический параболоид) помогает идентифицировать типологию комбинированного воздействия Cu и Pb на клетки IMR-32.

3. При малых дозах Cu и Pb картина совместного действия вполне точно описывается термином «аддитивность», затем с ростом концентраций переходящая в антагонизм.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Copper homeostasis and copper-induced cell death in the pathogenesis of cardiovascular disease and therapeutic strategies / X. Chen, Q. Cai, R. Liang [et al.] // *Cell Death and Diseases*. – 2023. – Vol. 14, №2. – P. 105. DOI: 10.1038/s41419-023-05639-w.
2. Copper Dyshomeostasis in Neurodegenerative Diseases – Therapeutic Implications / G. Gromadzka, B. Tarnacka, A. Flaga, A. Adamczyk // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21, №23. – P. 2-35. DOI: 10.3390/ijms21239259.
3. Bioaccumulation of lead (Pb) and its effects on human: A review / M. Collin, S. K. Venkatraman, N. Vijayakumar [et al.] // *Journal of Hazardous Materials Advances*. – 2022. – Vol. 7. – P. 100094. DOI: 10.1016/j.hazadv.2022.100094
4. Synergistic effects of lead and copper co-exposure on promoting oxidative stress and apoptosis in the neuronal cells / D. Wu, D. Wang, S.-S. Tan [et al.] // *Toxicology*. – 2025. – Vol. 513. DOI: 10.1016/j.tox.2025.154103.
5. Toxicity of binary mixtures of copper, lead, and glyphosate on neuronal cells / C. Collom, S. H. Pradhan, J. Y. Liu [et al.] // *Journal of Hazardous Materials Advances*. – 2023. – Vol. 11. – P. 100355. DOI: 10.1016/j.hazadv.2023.100355.
6. Comparative In Vitro Toxicity Evaluation of Heavy Metals (Lead, Cadmium, Arsenic, and Methylmercury) on HT-22 Hippocampal Cell Line. / V. Karri, V. Kumar, D. Ramos [et al.] // *Biological Trace Element Research*. – 2018. – Vol. 184. – P. 226-239. DOI: 10.1007/s12011-017-1177-x.

Сведения об авторах

Л. В. Шабардина – младший научный сотрудник

Е. А. Килина* – лаборант-исследователь НПО ЛДТ ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора; студент магистратуры

И.А. Минигалиева – доктор биологических наук, заведующий отделом токсикологии и биопрофилактики

Т.В. Бушуева – доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник НПО Лабораторно-диагностических технологий

Information about the authors

L. V. Shabardina – Researcher

E. A. Kilina* – Laboratory Researcher at Yekaterinburg Medical Research Center for Prophylaxis and Health Protection in Industrial Workers; M. S. student

I.A. Minigalieva – Doctor of Sciences (Biology), Head of the Department of Toxicology and Bioprophylaxis

T.V. Bushueva – Doctor of Sciences (Medicine), Leading Researcher at Research and Production Association of Laboratory Diagnostic Technologies

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

ekat.kilina20@yandex.ru