

ПРОТЕКТИВНЫЙ ЭФФЕКТ МИЛДРОНАТА ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ РТУТИ ХЛОРИДА НА КУЛЬТУРУ КЛЕТОК НЕЙРОБЛАСТОМЫ

Надійшла 05.05.14

Исследовали токсическое действие ртути хлорида (10.9 мкМ) на культуру клеток нейробластомы IMR-32 и возможное протективное действие кардиопротектора милдроната (тестируемые концентрации 0.01–10.0 мг/мл культуральной среды) в подобных экспериментальных условиях. Изолированное добавление милдроната к среде не приводило к значительным негативным эффектам (количество погибших клеток не превышало 8–10 % общего количества при всех указанных концентрациях). В случае изолированного воздействия HgCl₂ погибала почти половина культивируемых клеток IMR-32 (живыми оставались в среднем 55.8 ± 1.6 %). Милдронат в концентрации 0.01 мг/мл не проявлял существенного протективного действия, но при его дозах 1.0 и 10.0 мг/мл усредненное количество живых клеток в среде, содержащей HgCl₂, достигало почти 80 %. Таким образом, милдронат продемонстрировал относительную безопасность *in vitro* и существенный протективный эффект в условиях интоксикации ртутью в малых дозах.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: интоксикация, ртути (II) хлорид, милдронат, культура клеток, нейробласт.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что длительное воздействие загрязнителей окружающей среды даже в небольших дозах может привести к патологическим процессам в нервной системе. Тяжелые металлы, особенно ртуть, играют в данном аспекте важнейшую роль [1]. В связи с этим актуален поиск препаратов, потенциально способных защищать ЦНС от отравления малыми количествами ртути [2].

Было установлено, что милдронат – один из кардиопротективных препаратов [3] – оказывает также заметное положительное влияние при нарушениях мозгового кровообращения и функционирования ЦНС [4]. Не исключено, что спектр позитивных эффектов этого агента может оказаться более широким и он может проявлять защитное действие в условиях интоксикации солями тяжелых металлов.

Мы попытались оценить эффективность и безопасность использования милдроната *in vitro* при токсическом воздействии ртути хлорида (сулемы) в малых дозах на культуру клеток нейробластомы че-

ловека.

МЕТОДИКА

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 (это позволяет экстраполировать получаемые результаты на нейроны). Клетки культивировали в полной культуральной среде RPMI 1640 («Sigma», США) с добавлением 4 мМ L-глутамин и 10 % эмбриональной телячьей сыворотки («Sigma», США) в увлажненной воздушной среде с 5 % CO₂ при 37 °С. 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 ртути (II) хлорид в концентрации 10.9 мкМ. Каждое культивирование в присутствии токсического агента производили в трех параллельных рядах. Клетки в среде без

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).

добавления ртути хлорида служили контролем.

Чувствительность клеток к действию ртути хлорида, милдроната и ртути хлорида в присутствии милдроната оценивали после их окрашивания трипановым синим в соответствии с методикой Май-Грюнвальда. Концентрацию милдроната в культуральной среде варьировали от 0.01 до 10.0 мг/мл. Живые клетки подсчитывали с использованием гемцитометра и определяли их относительное количество (%). Межгрупповые сравнения выполняли с помощью *t*-теста Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В культурах с добавлением к среде милдроната во всех использованных концентрациях наблюдалось значительное количество плотно упакованных живых клеток. Среди них преобладали небольшие базофильные веретенновидные, треугольные или полигональные клетки с несколькими отростками. Подобные клеточные элементы определялись как нейробласты. Большие светлые округлые клетки были идентифицированы как фибробласты. Поврежденные клетки обнаруживались в небольших количествах (рис. 1). Нормированное количество живых клеток было самым высоким при концентрации милдроната 1.0 мг/мл и самым низким при высшей тестированной концентрации (10.0 мг/мл). Таким образом, изолированное присутствие милдроната в культуральной среде обуславливало некоторое уменьшение количества живых клеток, но соответствующий декремент незначитель-

но превышал 10 % лишь в случае концентрации 10.0 мг/мл (см. рисунок, 1, 3).

Воздействие ртути хлорида без фармакологической коррекции приводило к существенному снижению относительного количества живых культивируемых клеток (почти вдвое, в среднем на 45.2 % по сравнению с контролем). В условиях же совместного присутствия ртути хлорида и милдроната в концентрациях 10.0 и 1.0 мг/мл количество живых клеток было существенно большим, чем в условиях изолированного воздействия интоксиканта. Относительное количество погибших клеточных элементов не превышало 21 % (см. рисунок, 2, 4). Многие клетки находились в процессе митотического деления.

В случаях применения ртути хлорида и милдроната в низких концентрациях (0.1 и 0.01 мг/мл соответственно) количества живых клеток оказались заметно меньшими, чем в культурах с более высокой концентрацией возможного протектора. Милдронат в самой низкой из использованных концентраций (0.01 мг/мл) почти не проявлял протективного действия.

Таким образом, оценка последствий применения милдроната в культуре клеток IMR-32 показала, что данный препарат оказался относительно безопасным во всем диапазоне исследованных концентраций (0.01–10.0 мг/мл); количество живых клеток в культуре было наивысшим при концентрации 1.0 мг/мл (в этих случаях погибало менее 8-9 % клеток). Экспозиция клеточной культуры IMR-32 в условиях воздействия сулемы выявила весьма существенную нейропротективную эффективность

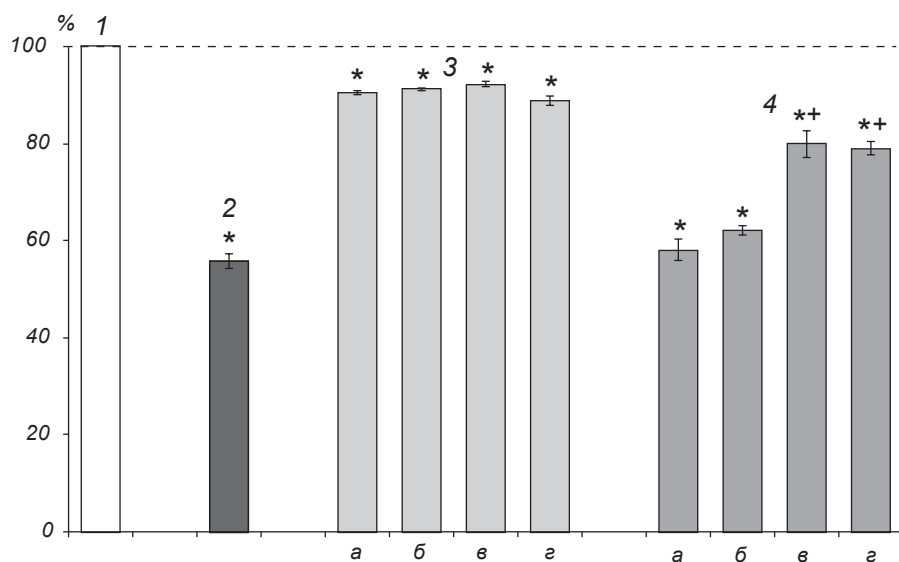


Рис. 1. Нормированные количества живых культивируемых клеток нейробластомы (%).

1 – в условиях контроля (принято за 100 %), 2 – в присутствии в культуральной среде 10.9 мкМ ртути хлорида, 3 – милдроната, 4 – одновременного присутствия ртути хлорида и милдроната. На фрагментах 3 и 4 концентрация милдроната для столбцов а – г 0.01, 0.1, 1.0 и 10.0 мг/мл соответственно. Звездочкой обозначены случаи достоверного различия ($P < 0.05$) при сравнении с контролем, крестиком – различия при сравнении с показателем при изолированном действии ртути хлорида.

Рис. 1. Нормовані кількості живих культивованих клітин нейробластомы (%).

милдроната в случаях его наличия в концентрациях 1.0 и 10.0 мг/мл.

Неврологические повреждения, вызываемые малыми количествами ртути и ее соединений, обусловлены воздействием ряда факторов. Это, прежде всего, взаимодействие ртути с белками, в которых присутствуют SH-группы, и развитие оксидативного стресса, сопровождаемого гиперпродукцией свободных радикалов. Подобные эффекты обуславливают формирование иммунных реакций и нарушения в системе гемостаза (микро- и макроангиопатии). Упомянутые факторы в той или иной степени связаны с метаболизмом жирных кислот и перекисным окислением липидов, что имеет особое значение для функций нервной ткани [5]. Кардио- и нейропротекторное действие милдроната, очевидно, обусловлено прежде всего его ингибирующим влиянием на перекисное окисление жирных кислот [3, 6]. Поэтому можно предположить, что именно подавление перекисного окисления жирных кислот милдронатом в определенной степени защищает нейроны (или нейроподобные клетки) в условиях интоксикации малыми количествами ртути.

Таким образом, милдронат продемонстрировал относительную безопасность в случае его изолированного присутствия *in vitro* в концентрации порядка 1.0 мг/мл. Его нейропротективная эффективность при интоксикации тяжелыми металлами (в частности, ртутью) может быть связана с ингибированием перекисного окисления жирных кислот. Результаты нашего исследования дают основания для дальнейшего исследования нейропротективных эффектов милдроната в экспериментах *in vivo*.

Л. М. Сокуренько¹, Ю. Б. Чайковський¹

ПРОТЕКТИВНИЙ ЕФЕКТ МІЛДРОНАТУ ПРИ ТОКСИЧНІЙ ДІЇ РТУТІ ХЛОРИДУ НА КУЛЬТУРУ КЛІТИН НЕЙРОБЛАСТОМИ

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

Резюме

Досліджували токсичну дію ртуті хлориду (10.9 мкМ) на культуру клітин нейробластоми IMR-32 та можливу протективну дію кардіопротектора милдронату (тестовані концентрації 0.01–10.0 мг/мл культурального середовища) в подібних експериментальних умовах. Ізольоване додання милдронату до середовища не призводило до значних негативних ефектів (кількість загиблених клітин не перевищува-

ла 8–10 % загальної кількості при всіх вказаних концентраціях). У разі ізольованої дії HgCl₂ гинула майже половина культивованих клітин IMR-32 (живими лишилися у середньому 55.8 ± 1.6 %). Милдронат у концентрації 0.01 мг/мл не виявляв істотної протективної дії, але при його дозах 1.0 і 10.0 мг/мл усереднена кількість живих клітин у середовищі з наявністю HgCl₂ сягала майже 80 %. Таким чином, милдронат продемонстрував відносно безпечність *in vitro* та істотний протективний ефект в умовах інтоксикації ртуттю в малих дозах.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. T. W. Clarkson and L. Magos, "The toxicology of mercury and its chemical compounds," *Crit. Rev. Toxicol.*, **36**, 609-662 (2006).
2. J. P. Rooney, "The role of thiols, dithiols, nutritional factors and interacting ligands in the toxicology of mercury," *Toxicology*, **234**, 145-156 (2007).
3. I. Kalvinsh, *Mildronate: The Mechanisms of Action and Perspectives of Use*, Grindex, Riga (2002).
4. N. Sjakste, A. Gutaitis, and I. Kalvinsh, "Mildronate: an antiischemic drug for neurological indications," *CNS Drug Rev.*, **11**, 151-168 (2005).
5. I. M. Trachtenberg, Yu. B. Chaikovskiy, and L. M. Sokurenko, "Morphological views on mercury intoxication pathogenesis (Review of literature)," *Mod. Probl. Toxicol.*, **1**, 11-17 (2008).
6. 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).