

УДК 611-018.82: 546.49'131:612.085.2

## ДОСЛІДЖЕННЯ ТОКСИЧНОЇ ДІЇ ХЛОРИДУ РТУТІ НА НЕЙРОНИ *IN VITRO*

**Сокурєнко А.М.**

Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця, м. Київ.

Цитотоксичну дію хлориду ртуті вивчали на культурах кліток IMR-32 (нейробластома людини). Різні дози хлориду ртуті впливають на виживаність та проліферацію нейронів у культурі клітин у різній мірі: у дозах 1000 та 100 мкМ/мл більш проявляється цитотоксичний ефект, а при дозах 1 та 0,1 мкМ/мл – пригнічення проліферації, обидва патологічні механізми в рівній мірі спостерігаються в дозі 10 мкМ/мл.

**Ключові слова:** інтоксикація, хлорид ртуті, мікромеркуріалізм, культура клітин, нервова тканина, нейрон, нейроглія

### Вступ

Поява нових сучасних технологій впливає на розвиток медичних і біологічних наук, включаючи токсикологію, і морфологію [1, 2]. Увага токсикологів переміщується з тварини, людини і їхніх популяцій на окремі тканини і клітини тварини і людини. Тобто, у наукові дослідження впроваджуються альтернативні методи *in vitro* поряд із традиційними експериментами на тваринах [3, 4]. Передумовою виникнення та поширення їхнього застосування стала концепція трьох R, що передбачала: редукцію (*reduction*) або зниження кількості тварин, які використовуються в досліді; уточнення (*refinement*) або вдосконалення протоколів, і заміну (*replacement*) дослідів *in vivo in vitro* (тобто досліді, що проводяться поза живою твариною), комп'ютерних моделей або тестів на нижчих хребетних, і безхребетних видах [2]. Цю концепцію було описано в книзі, опублікованій в 1959 р. двома вченими з Великої Британії W.M.S. Russell і Rex Burch під назвою: «Принципи гуманних експериментальних методів» (*The Principles of Humane Experimental Technique*). Сьогодні концепція «Три R» є найбільш передовою в галузі наукових досліджень.

*Мета дослідження* – оцінка цитотоксичної дії хлориду ртуті на нейрони – основний диферон нервової тканини.

### Матеріали та методи дослідження

Цитотоксичну дію хлориду ртуті вивчали методом двократних серійних розведень на перещеплюваних культурах клітин IMR-32 (нейробластома людини), які були вирощені в стандартних умовах і утворювали моношар. Вибір даної культури клітин обумовлений походженням з клітин організму людини, порівняною легкістю культивування, а також

нейрогенним походженням, що дозволяє екстраполювати результати на нейрони. Живильне середовище, у якому культивували клітини: RPMI 1640 («SIGMA», USA), 4 ммоль/л L-глутаміну, 10 % ембріональної сироватки теляти («SIGMA», USA), у зволоженої атмосфері з 5 % CO<sub>2</sub> при 37 °С. Пересів клітин здійснювали за допомогою розчину версена (0,02 %, «БіоТест-лабораторія», Україна) при утворенні клітинами на субстраті суцільного моношару (четверта доба росту), заміщали середовищем, що містить хлорид ртуті (II) у концентраціях від 1 мМ/мл до 0,1 мкМ/мл. Кожне розведення хімічного агента досліджували в 3 паралельних серіях. За контроль взяли клітини без додавання хімічних сполук.

Чутливість клітин до дії хлориду ртуті в присутності досліджуваних антидотів вивчали за інгібіцією цитотоксичного ефекту ртуті при фарбуванні клітин трипановим синім, підрахунок клітин здійснювали за допомогою гемоцитометра. При цьому клітини висівали на 24-лункові планшети з концентрацією  $4 \cdot 10^4$  клітин /лунку (в 1 мл середовища), через 24 години вносили хлорид ртуті та антидоти й інкубували протягом 48 годин за стандартних умов. Підрахунок клітин здійснювали за допомогою гемоцитометра, фарбували клітини вітальним барвником – 0,4 % трипановим синім, кількість клітин визначали за формулою:

$$A/80 \times 2 = X \cdot 10^6 \text{ (клітин у мілілітрі середовища),}$$

де, A – кількість клітин, що було пораховано в камері Горяєва (в 5 квадратах),  $\times 2$  – розведення із трипановим синім (1:1). Забарвлені клітини рахували в мікроскопі.

Отримували морфометричні дані: відсотки живих та мертвих клітин нейронів в експерименті, індекси цитопатичних змін по мертвим клітинам та живим клітинам нейронів, індекси проліферації по мертвим, живим та загальній кількості клітин.

## Результати досліджень та їх обговорення

При дослідженні нейронів ліній IMR-32 спостерігали повну відсутність живих клітин при дозах 1000 та 100 мкМ/мл, а в дозі 100 мкМ/мл з'явилася їхня невелика кількість на пізніх строках (рис. 1).

Індекс цитопатичних змін по мертвим клітинам ліній IMR-32 при ранніх термінах дослідження при дозах 1000 та 100 мкМ/мл достовірно більший від контрольного показника в більш ніж у десять разів. При дозі 100 мкМ/мл цей показник достовірно менший, ніж при концентрації хлориду ртуті 1000 мкМ/мл (рис. 2).

Індекси цитопатичних змін по живим клітинам для цих доз дорівнюють нулю, а на пізніх термінах для концентрації 100 мкМ/мл —  $0,1 \pm 0,02$ , що все ж менше контрольного показника. Індекси проліферації нейронів при дослідженні дози 1000 мкМ/мл та 100 мкМ/мл статистично достовірно нижчі контрольного: по всім клітинам та мертвим, та дорівнює нулю по живим клітинам (рис. 3).

При 10 мкМ/мл у культурі нейронів достовірно збільшується порівняно з попередньою дозою кіль-

кість живих клітин, яка статистично менша, ніж у контролі (рис. 1). Індекс цитопатичних змін по мертвим клітинам достовірно зменшується, але статистично значимо, в 5–6 разів більше нормального, а співвідношення живих клітин до таких у контролі достовірно збільшується відносно досліді з попередньою дозою, хоча й достовірно менше ніж у контролі (рис. 2). При концентрації 10 мкМ/мл індекси проліферації по всім клітинам і проліферації по живим клітинам достовірно зростають порівняно з попередньою групою, хоча обидва достовірно менше показників контролю, а по мертвим статистично вірогідно збільшується відносно інших груп порівняння (рис. 3).

При дозі 1 мкМ/мл на ранніх термінах експерименту кількість живих клітин статистично вірогідно більше ніж при концентрації 10 мкМ/мл, хоча і достовірно менше значення в експерименті без впливу солі ртуті. А на пізніх строках виживаність клітин достовірно зростає по відношенню до попередньої дози та наближається до значень досліді без впливу сулеми (рис. 1). Індекс цитопатичних змін по мертвим клітинам поступово достовірно зменшується, наближаючись на 48 годину до контролю, а по живим збільшується, також наближається до контролю в пізні строки (рис. 2). Індекси проліферації по всім клітинам у групі з використанням дози 1 мкМ/мл аналогічні нормі та показнику попередньої дози. Індекс проліферації по живим клітинам також збільшується відносно показника в більшій дозі, але залишається менше значення контролю. Індекс проліферації по мертвим клітинам не має значущих відмінностей від значення показників контролю, але достовірно більший від результату при попередній концентрації (рис. 3).

При концентрації 0,1 мкМ/мл відсоток живих клітин достовірно збільшується порівняно з попередньою концентрацією, наближаючись до значення досліді без впливу сулеми (рис. 1). Індекси цитопатичних змін наближаються до нормальних та достовірно більші від індексів у попередній дозі (рис. 2). Індекс по живим клітинам також наближається до контролю. Індекси проліферації дорівнюють величинам контролю, а індекси по всім та живим клітинам статистично достовірно більші від аналогічних показників у дозі 1 мкМ/мл (рис. 3).

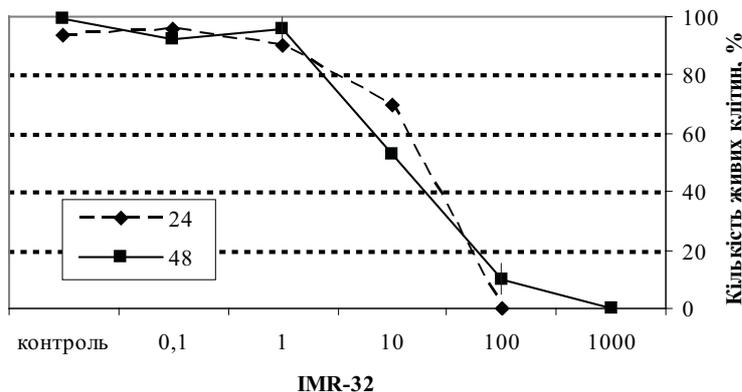


Рис. 1. Чутливість клітин IMR-32 до різних доз хлориду ртуті.

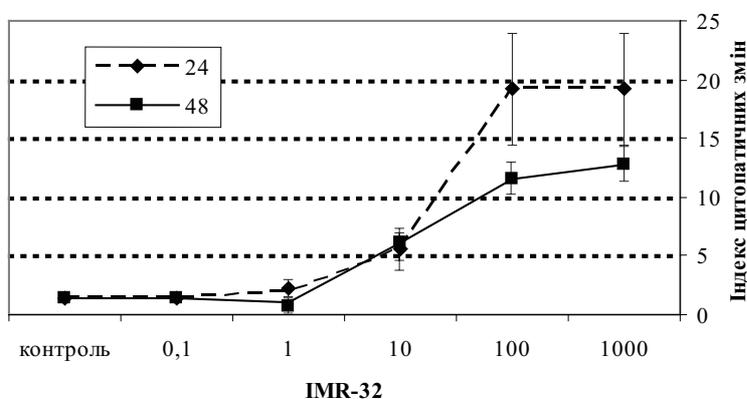


Рис. 2. Індекс цитопатичних змін клітин IMR-32 при різних дозах хлориду ртуті.

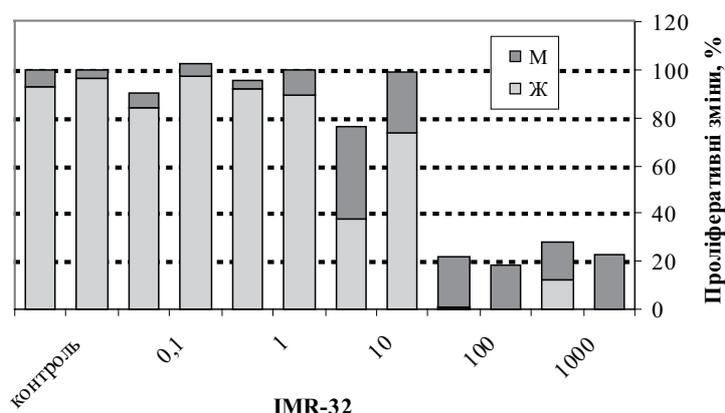


Рис. 3. Індекси проліферативних змін клітин IMR-32 при різних дозах хлориду ртуті.

### Висновки

Таким чином, різні дози хлориду ртуті впливають на виживаність та проліферацію нейронів у культурі клі-

### Література

1. Дейнека С.Є. Токсиколого-гігієнічні аспекти застосування методу культури клітин при комплексному вивченні сполук металів та оцінці засобів цитопротекції: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня докт. мед. наук / Дейнека С.Є.– К., 2000.– 33 с.
2. Альтернативні методи і тест системи / [Трахтенберг І.М., В.М. Коваленко, Н.В. Кокшарева та ін.]; за

Сокурєнко А. М.

### ИССЛЕДОВАНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ НЕЙРОНОВ К ХЛОРИДУ РТУТИ IN VITRO

Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца, г.Киев

Цитотоксическое действие хлорида ртути изучали на культурах клеток IMR-32 (нейробластома человека). Разные дозы хлорида ртути влияют на выживаемость и пролиферацию нейронов в культуре клеток в разной степени: в дозах 1000 и 100 мкМ/мл более проявляется цитотоксический эффект, а при дозах 1 и 0,1 мкМ/мл – угнетение пролиферации, оба патологических механизма в равной мере наблюдаются в дозе 10 мкМ/мл.

**Ключевые слова:** интоксикация, хлорид ртути, микромеркуриализм, культура клеток, нервная ткань, нейрон

Sokurenko L.M.

### RESEARCH OF NEURON SENSITIVITY TO MERCURY CHLORIDE IN VITRO

O.O. Bogomolets National Medical University, Kyiv

Cytotoxicological action of mercury chloride was studied in the cultures of cells IMR-32 (human neuroblastoma). The influence of different doses of mercury chloride on survivability and proliferation of neurons in the cell culture in different degree was studied. In doses 1000 and 100 мкМ/мл cytotoxic effect was more expressed, and at doses 1 and 0,1 мкМ/мл – inhibition of proliferation occurred, both pathological mechanisms were observed in the dose 10 мкМ/мл.

**Key words:** intoxication, mercury chloride, micromercurialism, cell culture, nervous tissue, neuron

Надійшла: 27.05.2009

**Контактна особа:** Сокурєнко Людмила Михайлівна, канд. мед. наук, кафедра гістології та ембріології, Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, 13, бульвар Шевченка, м.Київ, 01033.  
Тел. : 8 067 501-08-15.e-mail: [lu-sokurenko@mail.ru](mailto:lu-sokurenko@mail.ru).

тин у різній мірі: у дозах 1000 та 100 мкМ/мл більш проявляється цитотоксичний ефект, а при дозах 1 та 0,1 мкМ/мл – пригнічення проліферації, обидва патологічні механізми спостерігаються в дозі 10 мкМ/мл.

1. Перещеплювана культура нейронів IMR-32 проявляє високу чутливість до токсичної дії хлориду ртуті.

2. Дозозалежний вплив хлориду ртуті на нейрони в культурі клітин: у дозах 1000 та 100 мкМ/мл більш проявляється цитотоксичний ефект, а при дозах 1 та 0,1 мкМ/мл – пригнічення проліферації, обидва патологічні механізми спостерігаються в дозі 10 мкМ/мл.

*Перспективи подальших досліджень.*

У подальших дослідженнях буде проведено вивчення протекторного впливу антиоксидантів на культуру нейронів IMR-32 в умовах токсичної дії хлориду ртуті.

ред. академіка АМН України І.М. Трахтенберга.– К.: Авіцена, 2008.– 272с.

3. Хейли Бойд Э. Токсичность ртути: генетическая предрасположенность и синергические эффекты / Хейли Бойд Э. // Medical Veritas.– 2005.– № 9.– Р. 535–542.

4. Cell viability and proteomic analysis in cultured neurons exposed to methylmercury / [Vendrell et al.] // Hum Exp Toxicol.– 2007.– № 26.– Р. 263–272.