

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ Mn^{2+} НА ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТЬ КЛЕТОК НЕРВНОЙ ТКАНИ В КУЛЬТУРЕ

О.Н. Жук, В.Н. Никандров

Полесский государственный университет,

Институт физиологии НАН Беларуси, Беларусь; E-mail: nadulich@mail.ru

Марганец является истинным незаменимым биоэлементом. Поступая в организм человека и животных, он концентрируется в тканях, богатых митохондриями, способен проникать через гематоэнцефалический барьер. Этот элемент входит в состав митохондриальных супероксиддисмутазы, пируваткарбоксилазы, а также глутаминсинтетазы, катализирует образование связи глюкозамин-серин при синтезе глюкозамингликанов хряща, является кофактором окислительного фосфорилирования. Образует устойчивые комплексы с адениловыми нуклеотидами, марганец участвует в реализации каталитической функции таких энзимов как аденилаткиназа, аргининкиназа, фосфоэнолпируваткарбоксилаза, креатинкиназа, глутаматдегидрогеназа, энлаза, изоцитратдегидрогеназа, малатдегидрогеназа, пентозоизомераза (Доклад ВОЗ, 1985; В.Е. Зайчик, Н. Агаджанян, 2004; K. Zablocka-Slowinska, H. Grajeta, 2012; T.E. Gunter et al., 2013).

Почвы, растительность и продукты питания Республики Беларусь характеризуются недостаточным уровнем этого микроэлемента. Так, при обследовании более 30 скотоводческих хозяйств Беларуси в крови крупного рогатого скота установлено в 96,2% случаев низкое содержание марганца (М.Н. Кучинский, 2010).

Вместе с тем, избыточное поступление марганца в организм человека и животных вызывает ряд патологических сдвигов с типичными признаками поражения центральной нервной системы, включая дегенеративные изменения в полосатом теле, бледном ядре и черной субстанции головного мозга (J. Ebany et al., 2013; M. Farina et al., 2013; M. Sidorik-Weqrzypoviczc, 2013; и другие). Очаги поражения наблюдались также в гипоталамусе, коре, мозжечке и стволе головного мозга. Интоксикация марганцем у животных вызывает повреждение части нейронов и резко выраженный глиоз. Психические и неврологические симптомы при интоксикации марганцем схожи с таковыми при экстрапирамидных нарушениях, например при паркинсонизме. Полагают, что это обусловлено снижением уровня дофамина и, вероятно, серотонина. Механизмы нейротоксичности марганца полностью не расшифрованы. Показано, что этот элемент вызывает окислительный стресс – один из главных факторов в увеличении проницаемости биомембран, включая митохондриальные, что, в свою очередь, ведет к коллоидному осмотическому набуханию матрикса самих клеток и матрикса митохондрий. Предполагают, что этим обусловлена дисфункция митохондрий, ведущая к угнетению окислительного фосфорилирования.

Избыточное поступление марганца в организм человека и животных наблюдается вблизи металлургических производств, при сварке, производстве сухих гальванических элементов, производстве и использовании соединений марганца для обработки пищевых сельскохозяйственных культур фунгицидами. Его производное широко используется как антидетонационная присадка в бензине, нередко марганец в повышенных концентрациях присутствует в напорных подземных водах Беларуси. Кроме того, описан ряд случаев отравления детей растворами перманганата калия.

Цель настоящей работы – установить особенности влияния ионов Mn^{2+} на клетки культуры неокортекса новорожденной крысы, клетки крысиной глиомы С6 и их протеолитическую активность.

Исследования проведены на органотипических и диссоциированных культурах коры головного мозга новорожденных крыс и на перевиваемой клеточной линии крысиной глиомы С6. Все культуры выращены в синтетической питательной среде ДМЕМ (Sigma, США), содержащей 10% телячьей эмбриональной сыворотки крови (ТС, Sigma, США) в CO_2 -инкубаторе "HeraCell" (Швейцария) при 37 °С в атмосфере 5% CO_2 и 95% воздуха. Смену питательной среды проводили 1 раз в 2–3 сут. $MnCl_2$ (10^{-1} – 10^{-6} М) добавляли в питательную среду, содержащую 10% ТС. Время наблюдения 1–14 суток *in vitro*. Количество исследованных культур в каждой серии составило ≥ 10 .

На культурах неокортекса новорожденной крысы установлено, что добавление $MnCl_2$ в концентрациях 10^{-1} – 10^{-3} М уже через 24 ч сопровождалось необратимыми изменениями структуры клеток нервной ткани – сжатием и зернистостью цитоплазмы, утратой отростков нейронами и клетками глии и полной гибелью клеток. Со снижением концентрации $MnCl_2$ в ростовой среде уменьшалось и его токсическое действие. Так, при концентрации этой соли 10^{-6} М уже через 90 мин наблюдалось увеличение размеров клеток на 33,6% (за счет набухания) и увеличению межклеточных пространств, а через 24 ч увеличивалась доля двуядерных клеток, в цитоплазме некоторых клеток появлялись мелкие вакуоли и жировые включения.

В культурах клеток глиомы С6 при концентрации $MnCl_2$ 10^{-6} М наблюдались сжатие и гибель клеток, на 64% уменьшалась длина их отростков, уменьшалась их арборизация. Изменялось и внутриклеточное распределение витального красителя – нейтрального красного: в клетках контрольных культур краситель, в основном, локализовался в приядерной зоне, тогда как при воздействии марганца – по всей цитоплазме или же отсутствовал в клетках.

Судя по данным литературы, обращает на себя внимание практически отсутствие материалов о влиянии ионов Mn^{+2} на состояние звеньев одного из важнейших гомеостатических механизмов – протеолиза. Имеются лишь фрагментарные сообщения о присутствии ионов Mn^{+2} в карбоксипептидазах и лейцинаминопептидазе, не создающие сколько-нибудь целостной картины, а также о влиянии *in vitro* $MnCl_2$ на казеинолитическую и гемоглинолитическую активность трипсина, химотрипсина и папаина (В.Н. Никандров и соавт., 2014).

Уровень АТФ-активируемого протеолиза в клетках глиомы С6 при воздействии $MnCl_2$ в концентрации 10^{-4} М (но не 10^{-6} М) статистически значимо возрастал через 20 мин и 24 ч на 22 и 14% соответственно. Однако наиболее резкие изменения наблюдались со стороны Ca^{2+} -активируемого протеолиза в этих клетках. Так, уровень Ca^{2+} -I(мкМ)-протеолиза через 20 мин и 24 ч увеличился при действии $MnCl_2$ в концентрации 10^{-4} М на 31 и 71% соответственно, тогда как Ca^{2+} -II(мМ)-протеолиза – на 57 и 59%. При концентрации $MnCl_2$ 10^{-6} М уровень Ca^{2+} -I(мкМ)-протеолиза возрос в указанные интервалы времени на 68 и 46%, а Ca^{2+} -II(мМ)-протеолиза – на 35 и 46%.

Следовательно, в указанном диапазоне концентраций $MnCl_2$ оказал выраженное деструктивное действие на клетки нервной ткани культур неокортекса и глиомы С6, уменьшающееся при снижении концентрации фактора. Даже в минимальной концентрации при короткой экспозиции существенно возрастал уровень обеих форм Ca^{2+} -активируемого протеолиза, реакции которого в определенных ситуациях, судя по данным литературы, способны участвовать в разрушении структур клетки. Однако изложенных данных недостаточно для исчерпывающего объяснения особенностей токсического действия ионов Mn^{2+} , раскрытие всех сторон которого требует проведения широкого спектра дальнейших исследований. Авторы выражают благодарность Р.И. Гронской, Е.Ф. Полукошко и М.К. Тумилович за оказанную помощь в работе.