

На правах рукописи

ТУНЕВА Елена Олеговна

**Исследование токсического действия
алюминия
на нейроны и тимоциты мышей**

03.00.04 – биохимия

**Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

**Москва
2005 г.**

Работа выполнена в ГУ НИИ неврологии РАМН (Россия).

Научный руководитель:

Заслуженный деятель науки РФ,
доктор биологических наук, профессор
БОЛДЫРЕВ Александр Александрович

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
профессор КОДЕНЦОВА Вера Митрофановна

доктор биологических наук,
профессор КОБЛЯКОВ Валерий Александрович

Ведущее учреждение:

ГУ НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН

Защита состоится «__» _____ 2005 г. в «__» часов на заседании
диссертационного совета Д 212.203.13 при Российском университете
дружбы народов по адресу:
117198 ГСП, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологической
литературы по адресу: 117198 ГСП, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 8

Автореферат разослан «__» _____ 2005 г.

Ученый секретарь диссертационного Совета
кандидат фармацевтических наук, доцент

ЛАГУТКИНА Т. П.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Алюминий является одним из самых распространенных металлов на земле. Алюминий широко представлен в окружающей среде, и все живые существа поглощают его с пищей. При этом зачастую наблюдается накопление алюминия в тканях, поскольку в живых клетках не выработалось специфических систем, способных к его экскреции.

Проблема безопасности употребления алюминия с пищей или водой давно беспокоит людей. Накопление алюминия в организме интенсивно изучается, и существующие факты свидетельствуют о том, что этот процесс в мозге может сопровождать возникновение и развитие таких нейродегенеративных заболеваний, как болезнь Альцгеймера и паркинсонизм (Crapper et al, 1976; Trapp et al, 1978; Graves et al, 1990).

В то же время, представления о токсичности алюминия для организма человека до сих пор неоднозначны. Для людей, живущих в областях с повышенным содержанием алюминия в окружающей среде, обнаружена корреляция между содержанием алюминия в воде и частотой проявления болезни Альцгеймера (БА) (Martyn et al. 1989; Forbes et al. 1992).

Однако известны и примеры, отмечающие отсутствие у пациентов с нейродегенеративными заболеваниями накопления алюминия в тканях мозга по сравнению со здоровыми людьми. Расхождения в экспериментальных данных происходят, вероятно, из-за отсутствия достаточной информации о его локализации в пораженных участках мозга, а также и о механизмах его действия на возбудимые ткани.

Так или иначе, увеличивающееся производство алюминия для нужд промышленности и расширяющееся применение алюминиевых изделий в быту делают необходимым количественную оценку его токсического влияния на живые системы.

Цель и задачи исследования

Целью настоящей работы явилось количественное исследование токсического действия хлористого алюминия на клетки нервной и иммунной систем в условиях *in vitro*.

Для выполнения этой цели нами были поставлены следующие задачи: 1) Описать свойства нейронов и тимоцитов с помощью проточной цитометрии; 2) Охарактеризовать действие алюминия на нейроны и тимоциты грызунов; 3) Оценить токсический эффект хлористого алюминия на мембраны клеток и внутриклеточный уровень активных форм кислорода (АФК); 4) Охарактеризовать вид клеточной смерти, индуцируемой хлористым алюминием; 5) Сопоставить чувствительность тимоцитов и нейронов к токсическому действию хлористого алюминия; 6) Провести оценку взаимного влияния на нейроны алюминия и агониста глутамата N-метил-D-аспартата (NMDA), вызывающего эксайтотоксическое действие на глутаматергические структуры.

Научная новизна и практическая ценность работы

В работе впервые продемонстрирован токсический эффект низких концентраций алюминия (100 мкМ и ниже) на гранулярные клетки мозжечка и тимоциты 10-15 дневных мышей линии ICR. Методом проточной цитометрии прямо



продемонстрировано изменение гранулярности и размеров клеток, а также повышение внутриклеточного уровня активных форм кислорода и деполяризация клеточной мембраны под влиянием хлористого алюминия. Эти эффекты развиваются весьма быстро и коррелируют с концентрацией алюминия, добавленного в инкубационную среду.

Выяснено, что тимоциты более чувствительны к токсическому действию алюминия, чем гранулярные клетки мозжечка. Пороговой концентрацией $AlCl_3$ для тимоцитов является 25 мкМ, а для нейронов - 50 мкМ. Показано, что генерация АФК внутри клеток под воздействием алюминия подавляется антиоксидантом N-ацетилцистеином (NAC), при этом NAC не защищает клетки от гибели, следовательно, АФК не являются непосредственной причиной клеточной смерти. Мы обнаружили, что токсический эффект алюминия заключается в нарушении целостности клеточных мембран и массовой гибели клеток по пути некроза.

Нами также продемонстрировано увеличение флуоресцентного сигнала Fluo-3 AM, пропорциональное концентрации $AlCl_3$, но не подавляемое внутриклеточным кальциевым буфером ВАРТА. Флуоресцентный сигнал, измеряемый внутри клетки с помощью Fluo-3 AM в присутствии Са-комплексона ВАРТА, отражает накопление алюминия внутри клеток и может использоваться для его количественного определения во внутриклеточном пространстве.

Таким образом, мы показали что, алюминий проникает через клеточную мембрану и аккумулируется внутри клетки, приводя к ее гибели. Впервые было выявлено, что клеточная смерть под влиянием алюминия в условиях острого опыта происходит по пути некроза.

В работе продемонстрировано усиление алюминием токсического действия NMDA. Это подтверждает представления о способности алюминия индуцировать или усиливать нейродегенеративные заболевания, в основе которых лежат экзайтотоксические процессы, вызываемые нарушениями функционирования глутаматергической системы.

Результаты диссертации важны для исследования молекулярных механизмов нарушения метаболизма у организмов, живущих в среде с повышенным содержанием алюминия.

Положения, выносимые на защиту

В работе продемонстрирован токсический эффект хлористого алюминия на тимоциты и нейроны мозжечка мышей. Инкубация клеток с $AlCl_3$ вызывает осмотический эффект, выражающийся в увеличении размеров и гранулярности клеток. Одновременно наблюдается падение мембранного потенциала и клеточной смерти по пути некроза.

При инкубации клеток с хлористым алюминием наблюдается усиление внутриклеточной продукции свободных радикалов, хотя проникающий в клетки природный антиоксидант N-ацетилцистеин вызывает снижение стационарного уровня АФК, но не защищает клетки от действия $AlCl_3$. Одновременно продемонстрировано усиление алюминием экзайтотоксического эффекта NMDA на нейроны головного

мозга. Это позволяет считать алюминий фактором риска нейродегенеративных процессов.

Апробация работы

Апробация работы состоялась на межлабораторном семинаре ГУ НИИ неврологии РАМН 14 июля 2005 г. Материалы диссертации были доложены на II ежегодной конференции "High turbidity events: chemical intrusion and potential public health consequences" (2nd Annual New York City watershed science and technical Conference, Нью-Йорк, США, 21–23 сентября 2004) и на международной академической конференции в МГУ (Москва, Россия, 26–28 октября 2004).

Публикации

Материалы диссертации отражены в 9 печатных работах (6 статей и 3 тезисов докладов).

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из следующих разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты исследования и их обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список литературы». Работа изложена на _____ стр. печатного текста, содержит _____ рисунков и _____ таблиц. Список литературы включает _____ наименований.

ОБЩЕЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные В экспериментах использовали 10–15 дневных мышей линии ICR, содержащихся в стандартных условиях вивария. В работе использовано 155 животных.

Выделение гранулярных клеток из мозжечка мышей. Метод выделения клеток подробно описан в литературе (Oyama et al, 1996; Boldyrev et al, 1999). Животных декапитировали, и мозжечок помещали в охлажденный раствор Тироде (148 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM глюкозы, 10 mM HEPES, pH 7,4). Для получения индивидуальных гранулярных клеток мозжечка кусочки ткани инкубировали при 34°C в присутствии диспазы (2 мг/мл раствора Тироде, 400 ед активности) в течение 45 мин. После инкубации нейроны получали взмучиванием и фильтровали через нейлоновый фильтр с размером ячеек 50 мкм. Концентрацию клеток в суспензии определяли в камере Горяева. Перед загрузкой лигандами клетки инкубировали 60 мин при 37°C.

Выделение тимоцитов проводили, используя мышей того же возраста (Okada et al, 2000). Животных декапитировали, извлекали тимус, промывали холодным раствором Тироде и измельчали. Для получения свободных тимоцитов кусочки ткани суспендировали пастеровской пипеткой. Полученную суспензию пропускали через нейлоновый фильтр (50 мкм). Количество выделенных клеток в суспензии определяли с помощью камеры Горяева. Перед загрузкой лигандами тимоциты (так же как и нейроны) инкубировали 60 мин при 37°C.

Подготовка клеток к эксперименту. Суспензию клеток нагружали соответствующими флуоресцентными красителями в течение 10–45 мин в зависимости от природы красителя (см. таблицу 1).

Таблица 1. Используемые флуоресцентные зонды

Оптическая (флуоресцентная) метка	Время инкубации, мин	Параметр
Светопротускивание/светорассеяние	30-210	Гранулярность и размеры клеток
DiBAC4(3)	10	Мембранный потенциал
Fluo-3 AM	45	Внутриклеточные ионы кальция и/или алюминия
CDCF	45	Активные формы кислорода (АФК)
Иодид пропидия	5	Некроз
Аннексин V	30	Апоптоз

Протокол эксперимента. Нагруженные клетки отмывали от избытка красителя и инкубировали с хлористым алюминием (0,025-5 мМ) в течение 30-210 мин. По завершении инкубации в пробы вносили иодистый пропидий (PI) и проводили анализ образцов на проточном цитометре (Beckman Coulter, EPICS ALTRA), измеряя их оптические свойства, а также флуоресценцию соответствующих красителей. Все процедуры с клетками, нагруженными светочувствительными зондами, для предотвращения засветки проводили при рассеянном освещении. В каждой индивидуальной пробе подсчитывали 10 000 событий. Каждое измерение проводили не менее 3 раз, повторяя экспериментальные серии 4-5 раз, используя животных разных пометов.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью компьютерной программы "Biostatistica", используя критерий t Стьюдента. Достоверными считали различия при значении $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Влияние $AlCl_3$ на осмотическую активность и жизнеспособность клеток

При инкубации нейронов с хлористым алюминием наблюдается изменение расположения нейронов в координатах прямого и обратного рассеяния («FS» против «SS», рис. 1). Этот эффект алюминия имеет отчетливую временную и концентрационную зависимость.

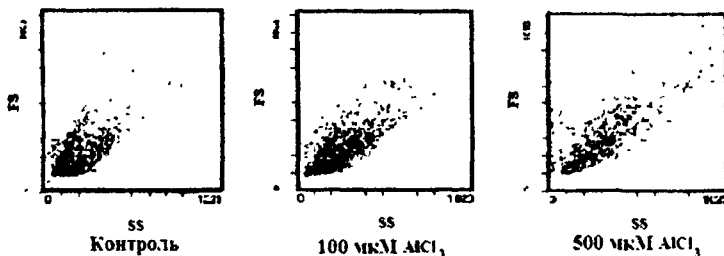


Рис. 1. Влияние алюминия на распределение гранулярных клеток мыши в координатах FS/SS (инкубация 60 мин, температура 37°C)

При добавлении в пробы нарастающих концентраций $AlCl_3$ (50 мкМ - 5 мМ) клетки «перемещаются» вверх по ординате, то есть увеличиваются в размере, что

соответствует их набуханию. Одновременно наблюдается перемещение клеток вдоль оси абсцисс, что соответствует росту клеточной гранулярности (Наупес, 1988). Аналогичные результаты были получены с тимоцитами (рис. 2), причем выяснилось, что эти клетки оказались более чувствительны к токсическому эффекту алюминия.

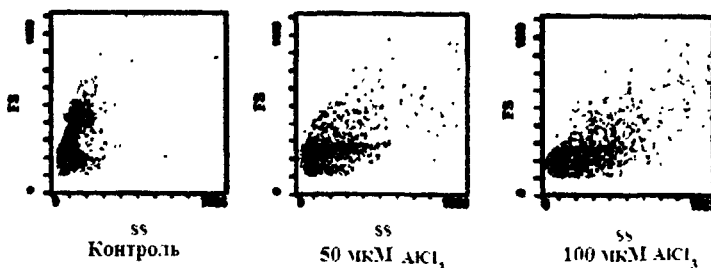


Рис. 2 Эффект алюминия на распределение тимоцитов в координатах FS/SS (инкубация 60 мин, температура 37°C)

Для выяснения того, какую роль играют внеклеточные ионы кальция и натрия в осмотическом феномене алюминия, мы провели аналогичные эксперименты с удалением из среды этих ионов. Для создания бескальцевой среды CaCl_2 в растворе Тироде был заменен на 1 мМ ЭГТА, а для создания безнатриевой среды той же осмотичности NaCl заменяли на удвоенную концентрацию сахарозы.

Как видно из рис. 3, как в бескальцевой, так и в безнатриевой среде эффект алюминия не претерпевает заметных изменений. Это позволило нам заключить, что обнаруженный осмотический эффект алюминия не опосредован внеклеточными ионами кальция или натрия, а развивается независимо от их присутствия.

В процессе выполнения описанных экспериментов мы проводили измерение мертвых клеток, выявляемых по окраске с PI. Обнаружилось, что инкубация клеток с AlCl_3 увеличивает окрашиваемость клеток иодистым пропидием. При этом вновь оказалось, что тимоциты более чувствительны к действию алюминия, чем нейроны - ответ первых проявляется с 25 мкМ, а вторых - со 100 мкМ AlCl_3 .

При инкубации нейронов с хлористым алюминием обнаруживается рост внутриклеточной флуоресценции CDCF и Fluo-3 AM, которые считаются маркерами на АФК и свободные ионы кальция соответственно. Этот эффект алюминия имеет отчетливую временную и концентрационную зависимость.

При добавлении в пробы нарастающей концентрации алюминия AlCl_3 (50 мкМ - 5 мМ) флуоресценция CDCF и Fluo-3 AM увеличивалась, что должно было соответствовать возрастанию в клетках уровня АФК и внутриклеточного кальция. Одновременно в пробах выявлялось уменьшение количества живых клеток. Аналогичные результаты были получены и с тимоцитами, причем и по этому параметру они были более чувствительны к токсическому эффекту алюминия.

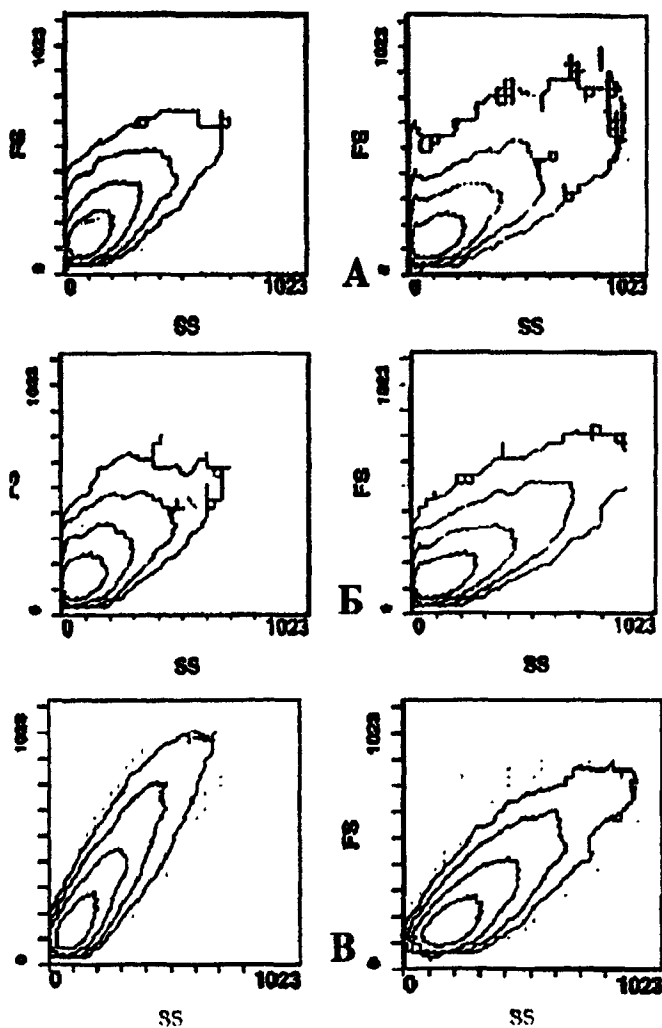


Рис. 3. Влияние кальция и натрия во внеклеточной среде на эффект алюминия на гранулярные клетки мозжечка. Слева – в отсутствие алюминия, справа – через 30 мин инкубации в присутствии $100 \mu\text{M AlCl}_3$. А – в нормальном растворе Тироде, Б – в отсутствие ионов кальция, В – в отсутствие ионов натрия. Инкубация 3 ч при 37°C . По оси ординат – прямое рассеяние (FS), по оси абсцисс – боковое рассеяние (SS)

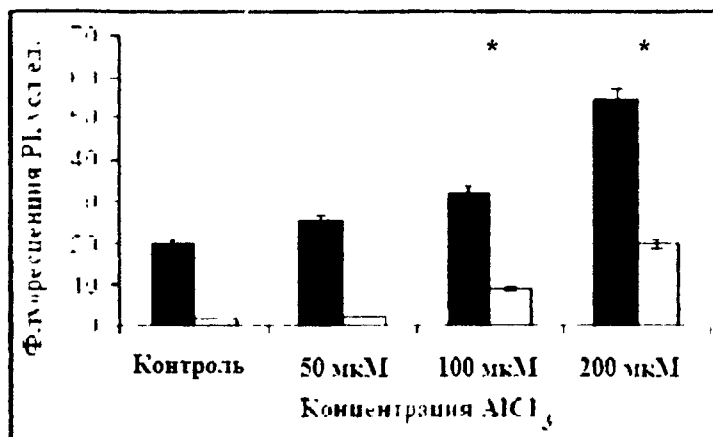


Рис. 4. Эффект алюминия на смертность нейронов (серые столбики) и тимоцитов (черные столбики). Инкубация 60 мин, температура 37°C. Знак «*» соответствует достоверному отличию результатов от соответствующего контроля ($p < 0,05$)

II. Влияние хлористого алюминия на уровень внутриклеточного кальция и АФК в нейронах и тимоцитах мышей

Для выяснения роли внеклеточного кальция в токсическом эффекте хлористого алюминия мы измеряли внутриклеточную флуоресценцию клеток, нагруженных CDCF и Fluo-3 AM, в бескальциевой среде, как было описано ранее. Из рис. 5 следует, что как в нормальных условиях, так и в бескальциевой среде эффект алюминия на измеряемые параметры не претерпевает заметных изменений. Это позволяет заключить, что обнаруженное нами токсическое действие хлористого алюминия развивается независимо от внеклеточного кальция.

Для выяснения того, какую роль играет внутриклеточный кальций в токсическом феномене алюминия, мы провели аналогичные эксперименты с внутриклеточным кальциевым буфером ВАРТА, способным хелатировать ионы кальция в цитоплазме. Индуцируя рост внутриклеточного кальция хлористым алюминием в клетках, предварительно нагруженных этим хелатором, мы предполагали выяснить, связана ли смерть клеток, индуцированная алюминием, с внутриклеточным фондом кальция.

Для выяснения того, какую роль играет уровень АФК в токсическом действии алюминия, мы провели эксперименты с N-ацетилцистеином, известным антиоксидантом, способным проникать через клеточную мембрану и снижать внутриклеточный уровень АФК.

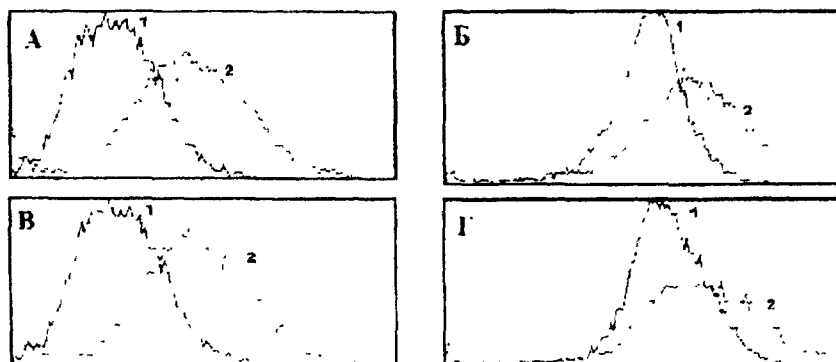


Рис. 5. Алюминий вызывает рост флуоресценции CDCF и Fluo-3 AM в нормальных условиях и в бескальциевой среде. А и В – флуоресценция CDCF, Б и Г – флуоресценция Fluo-3 AM. 1 - контроль, 2 - в присутствии 100 мкМ AlCl_3 . А и Б - нормальная среда, В и Г – в отсутствие кальция во внешней среде

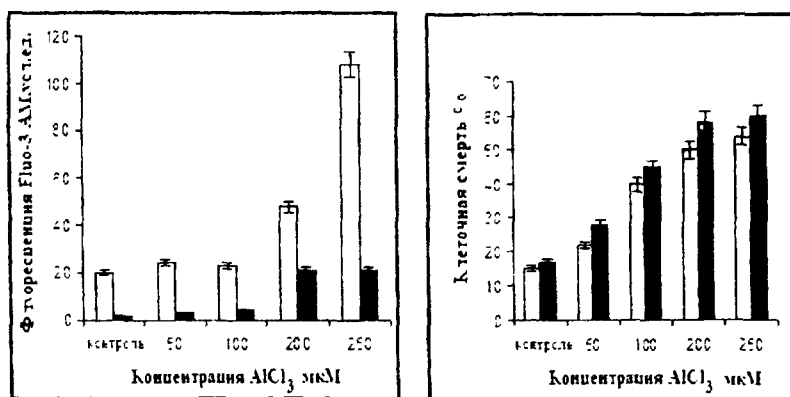


Рис. 6. Влияние хлористого алюминия на флуоресценцию Fluo-3 AM (слева) и PI (справа) в нейронах, инкубированных в течение 60 мин с разными концентрациями AlCl_3 . Белые столбики – инкубация в нормальных условиях; черные столбики – в присутствии 10 мкМ BAPTA

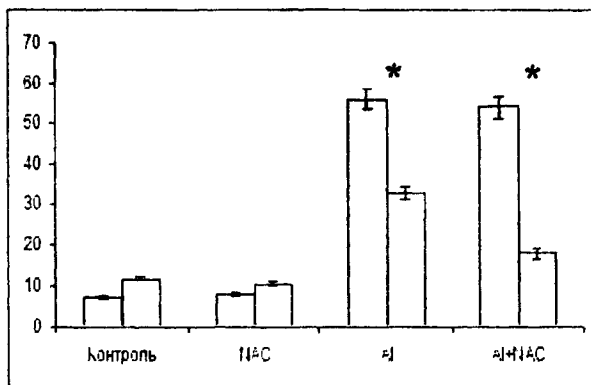


Рис. 7. Уровень флуоресценции CDCF (отн. ед., белые столбики) и процент мертвых клеток (отн. ед., серые столбики) в суспензии нейронов в контроле и после 30 мин инкубации с N-ацетилцистеином (NAC, 5 мМ) и хлористым алюминием (AlCl₃, 100 мМ) (по отдельности или совместно, как указано). Инкубация 30 мин при 37°C. Знак «*» соответствует достоверному отличию результатов от контроля (p<0,05)

Для выяснения того, не возникают ли во фракции живых клеток условия для индукции апоптоза, мы проводили одновременное окрашивание клеток флуоресцентными красителями на апоптоз (аннексин V) и некроз (PI). Для оценки возможности развития апоптоза был использован тест, позволяющий выявить клетки на стадии индукции программируемой клеточной смерти (Болдырев, 2000; Самуилов и др., 2000). Как следует из рис. 9, где ордината соответствует интенсивности окраски клеток иодистым пропидием (некроз), абсцисса – интенсивности окраски клеток аннексином V (ранние стадии апоптоза), под влиянием инкубации с хлористым алюминием клетки перемещаются «вверх» по оси мечения иодистым пропидием. При этом при низкой концентрации AlCl₃ (50 мкМ) некротические клетки концентрируются в квадранте 01, а при высокой концентрации AlCl₃ (100 мкМ) – в квадранте 02, что соответствует развитию легкого или тяжелого некроза соответственно (Болдырев, 2000).

Таблица 2. Влияния хлористого алюминия на измеряемые параметры (инкубация 60 мин, при 37°C).

Концентрация AlCl ₃	Флуоресценция DiBAC ₄ (3)	Флуоресценция Fluo3 AM	Флуоресценция CDCF
0	94 ± 0.47	40 ± 0.2	11 ± 0.55
100 мкМ	13 ± 0.65	46 ± 0.23	15 ± 0.75
200 мкМ	20 ± 1.0	64 ± 0.32	32 ± 1.6
500 мкМ	38 ± 1.9	183 ± 0.92	57 ± 2.85

В процессе выполнения описанных экспериментов мы измеряли долю мертвых клеток, выявляемую по окраске с PI. Обнаружилось, что инкубация клеток с $AlCl_3$ увеличивает их окрашиваемость нодистым пропидием пропорционально времени инкубации, причем флуоресценция CDCF живых клеток снижается (рис 8). Это позволяло заключить, что даже незначительные накопления алюминия внутри клетки приводят к подавлению ее жизнедеятельности. В этих условиях нам казалось важным установить путь, по которому осуществлялась смерть клеток.

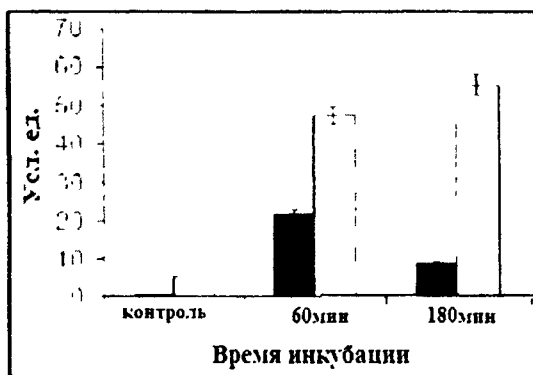


Рис. 8. Влияние хлористого алюминия на генерацию АФК и окрашивание клеток нодистым пропидием при разных временах инкубации (черные столбики – флуоресценция CDCF, белые – флуоресценция PI, усл. ед.)

Таким образом, даже кратковременная инкубация клеток в среде с $AlCl_3$ вызывает у них некротические изменения. Это указывает на высокую токсичность $AlCl_3$ для живых организмов, опасность которой будет неуклонно возрастать при длительной инкубации даже с низкими концентрациями $AlCl_3$ или при длительном времени экспозиции.

IV. Эксайтотоксическое действие алюминия

При активации нейронов NMDA происходит генерация АФК, и клетки выходят на новый стационарный уровень функционирования. NMDA является медиатором глутаматных рецепторов, которые играют важную роль в выполнении когнитивных функций мозга (Nedergaard et al, 2002). Известно, что «перегрузка» NMDA рецепторов медиатором приводит к так называемому эксайтотоксическому эффекту – возникают условия окислительного стресса, приводящего к гибели нейронов и повреждению функций мозга. Мы обнаружили, что алюминий усиливает токсичность NMDA, и совместное присутствие в среде обоих факторов вызывает кумулятивное возрастание уровня АФК, приводящее к клеточной смерти (рис 10 и таблица 3).

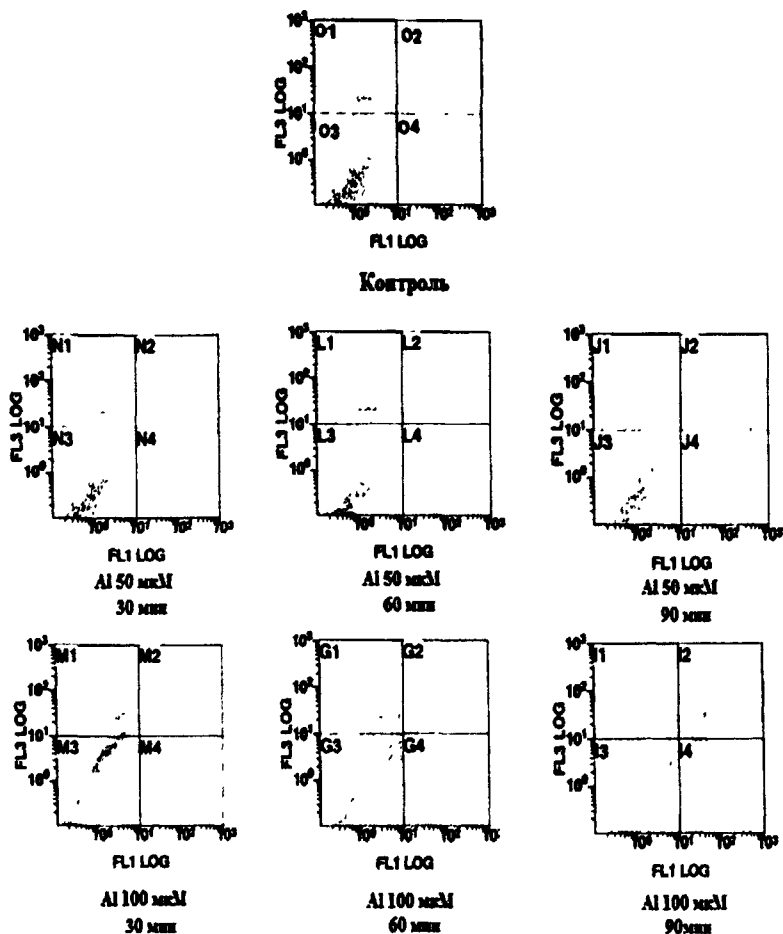


Рис. 9. Определение типа гибели нейрональных клеток с помощью двойного мечения – йодидом пропидия (FL3 LOG) и аннексином V (FL1 LOG)

Способность алюминия усиливать ответ нейронов на NMDA означает, что накопление алюминия в тканях мозга будет представлять собой постоянный фактор риска, создающий угрозу нормальному функционированию нейронов.

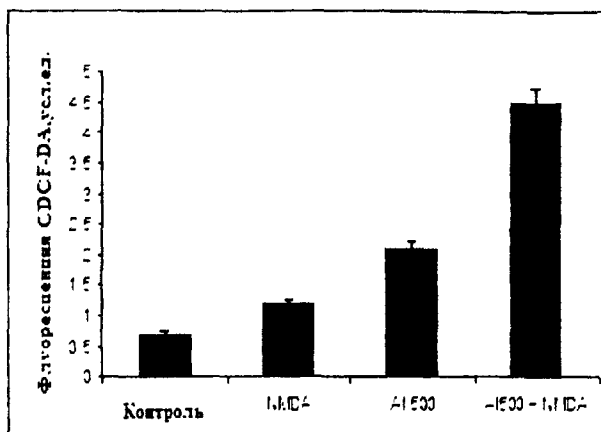


Рис. 10. Токсическое действие алюминия на нейроны, стимулированные NMDA. Концентрация NMDA 500 мкМ, концентрация AlCl_3 – 500 мкМ (инкубация 60 мин при 37°C)

Наши данные объясняют описанную в литературе корреляцию между уровнем алюминия в окружающей среде и риском нейродегенеративных заболеваний (Gupta, 2005).

Таблица 3. Смертность клеток в присутствии хлористого алюминия и NMDA (инкубация 60 мин при 37°C).

Концентрация AlCl_3 и NMDA	Смертность клеток, %	Достоверность отличий 4 от 3
1 Контроль	0	
2 500 мкМ NMDA	3	
3 500 мкМ AlCl_3	35	
4 AlCl_3 + NMDA	53	$p < 0.05$

Таким образом, из представленных данных вытекает, что токсическое действие алюминия будет наиболее опасно для активно функционирующих нейронов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Инкубация клеток с хлористым алюминием приводит к его быстрому накоплению во внутреннем пространстве клеток. В результате этого при инкубации нейронов и тимоцитов с хлористым алюминием наблюдается изменение расположения клеток в координатах прямого и обратного рассеивания при анализе на проточном цитометре. Этот эффект алюминия имеет отчетливую временную и

концентрационную зависимость, причем тимокиты более чувствительны к алюминию.

Как в бескальциевой, так и в безнатриевой среде токсическое действие алюминия не претерпевает заметных изменений. Это позволяло заключить, что обнаруженный нами осмотический эффект алюминия не опосредован внеклеточными ионами кальция или натрия, а развивается независимо. В процессе выполнения описанных экспериментов мы проводили измерение доли мертвых клеток, выявляемых по окраске с PI и обнаружили, что инкубация клеток с $AlCl_3$ увеличивает их окрашиваемость йодистым пропидием, что отражает создание в клетках условий для некротической смерти.

При инкубации нейронов с хлористым алюминием выявляется рост внутриклеточной флуоресценции CDCF и Fluo-3 AM, которые считаются маркерами на АФК и свободные ионы кальция. При добавлении в пробы нарастающей концентрации алюминия $AlCl_3$ (50 мкМ – 5 мМ) флуоресценция CDCF и Fluo-3 AM увеличивалась, что должно было соответствовать увеличению количества АФК и внутриклеточного кальция. Одновременно наблюдалась некротическая гибель клеток. Для выяснения роли внеклеточного кальция в токсическом эффекте хлористого алюминия мы провели аналогичные эксперименты в среде с удалением ионов кальция из инкубационной среды. Эти опыты показали, что как в нормальных условиях, так и в бескальциевой среде эффект алюминия не претерпевает заметных изменений. Мы заключили, что обнаруженный нами токсический эффект хлористого алюминия развивается независимо от внеклеточного кальция.

Для выяснения того, какую роль играет внутриклеточный кальций в токсическом феномене алюминия, мы провели аналогичные эксперименты с внутриклеточным кальциевым буфером BAPTA. Обнаружилось, что клетки, выдержанные 30 мин с 10 мкМ BAPTA и использованные вслед за этим в опытах с $AlCl_3$, продолжают генерировать флуоресцентный сигнал Fluo-3 AM. Это привело нас к выводу, что наблюдаемый нами сигнал отражает увеличение концентрации в клетках алюминия, а не ионов кальция.

В ходе выполнения описанных экспериментов мы проводили измерения мертвых клеток, выявляя их по окраске PI. Обнаружилось, что инкубация клеток с $AlCl_3$ увеличивает окрашивание клеток йодистым пропидием. При этом доля мертвых клеток не зависела от присутствия BAPTA, позволяя заключить, что этот эффект алюминия не опосредован уровнем внутриклеточного кальция, а отражает его собственное токсическое действие.

Для выяснения того, какую роль играет уровень АФК в токсическом действии алюминия, мы провели эксперименты с N-ацетилцистеином. В клетках, предварительно нагруженных НАС, сигнал CDCF действительно уменьшался, демонстрируя, что он определяется внутриклеточным уровнем АФК. Однако на смерности клеток присутствие антиоксиданта не отражалось. Это свидетельствует, что хотя клетки при инкубации с алюминием генерируют повышенный уровень АФК, свободные радикалы не являются основной причиной

клеточной смерти. При инкубации клеток с хлористым алюминием наблюдается рост внутриклеточного уровня АФК и деполяризация клеточной мембраны. При этом одновременно наблюдается увеличение процента мертвых клеток. Флуоресценция Fluo-3 AM, DiBAC₄(3) и CDCF нарастает примерно одинаковыми темпами, это демонстрирует наличие общей причины, вызывающей эти процессы – накопления алюминия внутри клеток.

По-видимому, даже незначительное накопление алюминия внутри клетки способно вызывать резкую деполяризацию мембраны и вызывать изменения, которые способствуют клеточной смерти. Для выяснения того, не создает ли алюминий в живых клетках условий для индукции программированной клеточной смерти (апоптоза), мы применили метод двойного окрашивания клеток флуоресцентными красителями – на апоптоз (аннексин V) и некроз (PI). Под влиянием инкубации с хлористым алюминием клетки перемещаются «вверх» по оси PI (что соответствует развитию некроза), хотя не метятся аннексином V. Это привело нас к заключению, что прямое токсическое действие алюминия на клетки вызывает их смерть по пути некроза, а не апоптоза.

Известно, что активация нейронов NMDA вызывает в них генерацию АФК. Мы обнаружили, что алюминий усиливает токсичность NMDA. Способность алюминия усиливать ответ нейронов на NMDA означает, что накопление алюминия в тканях мозга будет представлять собой постоянный фактор риска, создающий угрозу нормальному функционированию нейронов.

Накопление алюминия внутри клетки вызывает некротическую гибель клеток. При этом тимоциты более чувствительны к алюминию, чем нейроны, что может отражать большую опасность примесей алюминия для развивающихся организмов, поскольку за период эволюции живые организмы не выработали систем выведения алюминия из организма.

В экспериментальных условиях увеличение концентрации алюминия в питьевой воде с 0,15 мг/л до 0,40 мг/л приводит к значительной смертности животных в популяции. Для человека известно, что возрастание примеси алюминия с 0,02 мг/л до 0,11 мг/л увеличивает частоту возникновения болезни Альцгеймера. По стандартам «The USA Environmental Protection Agency» (US EPA) максимальная концентрация алюминия в питьевой воде не должна превышать 0,05 мг/л. Всемирная организация здравоохранения считает верхним пределом содержание алюминия в питьевой воде в дозе 0,2 мг/л. Эксперименты на животных показали, что употребление алюминия в дозе 2-10 мг на кг в день приводит к неполноценному росту потомства, ухудшению обучаемости, уменьшению размера животных и увеличению хрупкости их костей (Ferre et al, 1990).

Сопоставление дозовых зависимостей токсикантов *in vivo* с их концентрациями, применяемыми *in vitro* всегда вызывает затруднения, однако, имея в виду способность алюминия концентрироваться в тканях почти со 100-кратным превышением (Ferre et al, 1990), можно полагать, что накопление алюминия в организме в экстремальных условиях может создавать в тканях мозга концентрации, достигающие 200 мкМ, что по нашим данным является опасным

даже в условиях острого опыта Систематическое действие алюминия в условиях его накопления в тканях мозга безусловно может прямо вызывать нейродегенеративные изменения, а также демонстрировать токсическое действие на NMDA-рецепторы. Все это делает необходимым как выработку новых чувствительных подходов к оценке токсичности алюминия, так и исследование способов защиты организма от его повреждающего действия на клетки нервной и иммунной систем.

ВЫВОДЫ

1. Охарактеризованы свойства нейронов и тимоцитов грызунов с помощью проточной цитометрии.
2. Показано токсическое действие алюминия на нейроны и тимоциты мышей, заключающееся в увеличении осмотической активности клеток (увеличение размеров клеток и возрастание их гранулярности).
3. Эффект $AlCl_3$ сопровождается ростом АФК, изменением деполяризации мембранного потенциала и увеличением окраски клеток иодистым пропидием.
4. В используемых экспериментальных условиях смерть клеток, индуцируемая алюминием, является по своей природе некротической, а не апоптозной.
5. Тимоциты более чувствительны к токсическому действию алюминия, чем нейроны.
6. Алюминий увеличивает нейротоксический эффект NMDA, создавая предпосылки для нейродегенеративных заболеваний.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Тунева Е., Давыдова О., Болдырев А. // Влияние NMDA на генерацию активных форм кислорода лимфоцитами человека.- Бюлл. Эксп. Биол. Мед.- 2003.- Т.136. С.184-186.
2. Boldyrev A., Kazey V., Leinsoo T., Mashkina A., Tyulina O., Johnson P., Tuneva J., Chittur Sh., Carpenter D. // Rodent lymphocytes express functionally active glutamate receptors.- Biochem. Biophys. Res. Commun. - 2004.- V. 324. P. 133-139.
3. Болдырев А.А., Тунева Е.О. // N-Метил-D-аспартат стимулирует генерацию активных форм кислорода и активирует каспазу-3 в лимфоцитах мышей.- Биол. мембраны.- 2005.- Т. 22, С. 142-145.
4. Kazey V., Tuneva E., Boldyrev A. Production of reactive oxygen species by cerebellum granule cells isolated from senescence accelerated mice. In: The Senescence-Accelerated Mouse (SAM): an animal model of senescence (Nomura Y., Ed.), Elsevier, 2004, с. 245-249.

5. Тунева Е., Бирман И., Карпентер Д., Болдырев А. // Токсический эффект алюминия на гранулярные клетки мозжечка и тимоциты мышей.- *Нейрохимия*. -2005.- Т. 22, С. 1-6.
6. Tuneva J., Chittur Sh., Boldyrev A., Birman I., Carpenter D. Cerebellar granule cell death induced by aluminum. *Neurotox. Res.*-2005-. (submitted).
7. Boldyrev A., Tuneva E., Johnson P., Carpenter O. // Effect of NMDA on generation of reactive oxygen species in human leucocytes. *J. Neurochem.*-2004.- V. 90. P. 123.
8. Birman I., Tuneva J. // High turbidity events: chemical intrusion and potential public health consequences. 2nd Annual New York City watershed science and technical Conference, N-Y, USA (2004).
9. Tuneva J., Carpenter D., Birman I., Boldyrev A. // Effect of aluminum on neurons and thymocytes in mice determined by the cytometry approach. *Int. Academic and practical SUNY - MSU Conference "People and environment"*, Moscow, Russia (2004).

Тунева Елена Олеговна

**«Исследование токсического действия алюминия
на нейроны и тимоциты мышей»**

В работе исследован нейротоксический эффект алюминия на гранулярные клетки мозжечка и тимоциты мышей. С помощью проточной цитометрии в клетках было измерены стационарные уровни активных форм кислорода и ионизированного кальция, а также величины мембранного потенциала. Инкубация гранулярных клеток мозжечка и тимоцитов с 25-500 мкМ $AlCl_3$ вызывает дозо-зависимый осмотический эффект, проявляющийся в увеличении размеров и гранулярности клеток. Осмотический эффект не связан с внеклеточным фондом ионов натрия или кальция. Действие алюминия сопровождается ростом АФК внутри клеток и клеточной смертью, которая не снижается N-ацетилцистеином. Основной причиной вызываемой алюминием некротической гибели клеток является дестабилизация мембранного потенциала. Алюминий увеличивает токсическое действие N-метил-D-аспартата при инкубации нейронов с обоими лигандами. Тимоциты более чувствительны к токсическому действию алюминия.

Elena O. Tuneva

**«Toxic effects of aluminum ions on murine and neurons
thymocytes»**

Neurotoxic effect of aluminum on cerebellum granule cells and thymocytes of mice was studied using flow cytometry approach. Stationary levels of reactive oxygen species and ionized calcium as well as membrane potential were measured in the cells after incubation with 25-500 μM $AlCl_3$. Aluminum was found to induce dose-dependent effect of osmotic activation resulted in increase in cell size and granularity. This effect was not related to extracellular sodium or calcium pools but was accompanied with rise in the levels of reactive oxygen species. At the same time, aluminum induced cellular death which was not prevented by N-acetylcysteine. The main reason of Al-induced necrotic cellular death was destabilization of membrane potential. Addition of aluminum to the medium containing excitotoxic ligand N-methyl-D-aspartic acid increased its toxic action on the neurons. In all experiments, thymocytes were more sensitive to aluminum than neurons.

Подписано в печать 3. XI. 25. Формат 60x84/16.
Тираж 400 экз. Усл. печ. л. 1. Заказ 889

Типография Издательства РУДН
117923, ГСП-1, г. Москва, ул. Орджоникидзе, д. 3

№ 20646

РНБ Русский фонд

2006-4

22309