

## КЛІТИННІ ЕФЕКТИ ПРИ КОМБІНОВАНІЙ ДІЇ СОЛЕЙ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ ТА ІОНІЗУЮЧОГО ВИПРОМІНЕННЯ

Г. Й. Лавренчук

ДУ “Національний науковий центр радіаційної медицини АМН України”, м. Київ

---

**Ключові слова:** важкі метали, іонізуюче випромінення, культура клітин, виживання, мітоз, апоптоз.

---

Після аварії на Чорнобильській АЕС особливо гострою посталася проблема забруднення навколошнього середовища чинниками різної природи. Це викликано тим, що до хімічних забруднювачів техногенного походження внаслідок аварії додався радіаційний. Тому особливий інтерес являє собою вивчення ступеня токсичності різних металів у сукупності з радіаційно-ушкоджуючим агентом.

Серед хімічних речовин, що забруднюють навколошнє середовище, важкі метали (ВМ) і їх сполуки утворюють значну групу токсикантів, які віднесені до пріоритетних забруднювачів виробничого та оточуючого середовища [1–5].

Важливими є дослідження закономірностей впливу іонізуючого випромінення (ІВ) в умовах сумісної дії його з важкими металами на клітинному рівні. Саме тут формується основа порушень, які пізніше проявляються у вигляді різноманітних патологічних порушень на рівні організму.

У відомій нам літературі є окремі повідомлення про результати експериментальних досліджень комбінованої дії ВМ, зокрема сполук свинцю та нікелю і ІВ [6–8], в той час як дослідженю впливу кожного з цих факторів окремо присвячена значна кількість робіт. Тому, доцільнім є подальше поглиблена вивчення ефектів поєднаної дії радіації та важких металів на клітини.

**Мета дослідження** — вивчення особливостей комбінованого впливу іонізуючого випромінення та солей свинцю і нікелю на клітини *in vitro*.

**Матеріали і методи.** Експериментальні дослідження виконані на культурі клітин лінії L<sub>929</sub> (фібробласти мишей С3Н трансформовані метилхолантреном) [9]. Культивування клітин здійснювали у поживному середовищі, яке складалось із середовища RPMI-1640 (90%), ембріо-

нальної телячої сироватки (10%) та антибіотиків згідно зі стандартними методами роботи з клітинними штамами [10]. Клітини вирощували при постійній температурі 37°C на покривних скельцях розмірами 16×8 (мм), які знаходилися на дні скляних пляшечок, до конфлюентного стану моноліту (1–5 діб).

У дослідженнях були використані водорозчинні солі ВМ, а саме: ацетати свинцю ( $Pb(CH_3COO)_2$ ) та нікелю ( $Ni(CH_3COO)_2$ ). Контролем на ацетат-аніон був ацетат натрію ( $NaCH_3COO$ ). ВМ додавали в культуральне середовище через 24 год після посадки клітин (щоб іони ВМ не впливали на адгезію та розпластання клітин на скляній підложці) у вигляді водного розчину в концентраціях: 0.01, 0.1, 1.0, 10 та 100 мкмоль/л. Культивування клітин здійснювали упродовж 5 діб в присутності іонів ВМ.

Опромінювання культури клітин ІВ здійснювали на апараті “Тераторон” (джерело —  $^{60}Co$  1,2 Мев, потужність експозиційної дози  $4,3 \cdot 10^{-4}$  Кл/(кг·с) відстань до об'єкта 80 см) в дозах 0,5, 5,0 та 10,0 Гр через 24 год після експлантації. Поєднана дія ВМ та ІВ здійснювалась у двох варіантах: у першому варіанті ВМ додавали перед опроміненням, у другому — після опромінення.

Клітинні реакції оцінювали у різні терміни культивування за загальноприйнятими показниками життєздатності. Проліферативну активність клітин оцінювали за кінетикою росту: під оптичним мікроскопом “Axioscop” (West Germany) при збільшенні у 1000 разів у межах сітки площею  $0,05\text{ mm}^2$  підраховували загальну кількість клітин, кількість мітозів і кількість гігантських багатоядерних (2 і більше ядер) клітин. Міtotичний індекс та індекс гігантських багатоядерних клітин розраховувався на 1000 клітин (%).

При виконанні експериментальних досліджень було поаналізовано 975 препаратів культур клітин.

**Результати дослідження та їх обговорення.** Як відомо [1, 3], свинець належить до мікроелементів і в клітині розподіляється нерівномірно. Більше 85% свинцю (1,5 нмоль/мг білка) пов'язано з мітохондріями, 5% (0,09 нмоль/мг білка) знаходиться в ендоплазматичному ретикулумі, лізосомах і ядрі, 8% (0,14 нмоль/кг білка) пов'язано з фосфоліпідами, білками, АТФ та іншими компонентами цитозолю. У дослідженнях з еритроцитами показано, що свинець змінює проникність мембрани, блокує активні центри. Крім цього, іони  $Pb^{+2}$  зв'язуються з сульфгідрильних, фосфатними та карбоксильними групами мембрани, збільшують її жорсткість і знижують стійкість до осмотичного шоку.

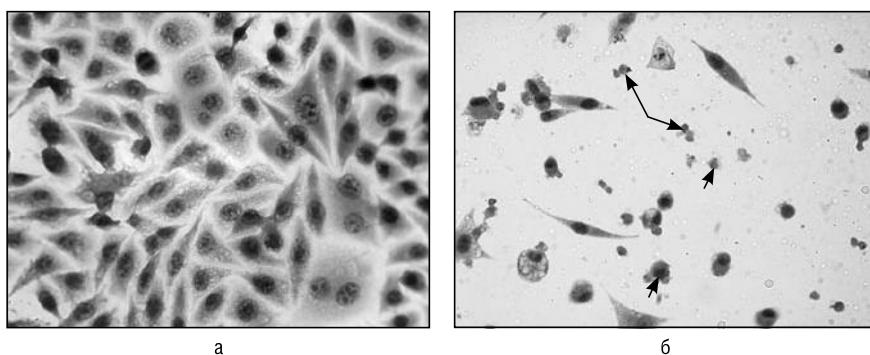
Вивчення епітеліальних клітин нефронів показало, що один з основних шляхів накопичення свинцю в клітині — утворення внутрішньоядерних включень. Однією з функцій цих структур є, мабуть, захист чутливих біохімічних систем клітин від токсичної дії свинцю. Зв'язування свинцю мітохондріальними мембранами залежить від дози і призводить до пригнічення її енергетизації.

На молекулярному рівні токсикація відбувається в результаті зв'язування іонами  $Pb^{+2}$  SH-груп. З тієї ж причини під дією іонів  $Pb^{+2}$  знижуються активність інших SH-вмісних ферментів, лактатдегідрогенази, а також концентрація відновленого глутатіону. Ці ефекти в свою чергу викликають різні аномалії функціонуванні клітин.

Експериментальні дослідження цитотоксичності іонів свинцю в тест-системі культури клітин показали (рис. 1, 2), що виживання клітин істотно залежить від концентрації катіонів у поживному середовищі: концентрація 1 мкмоль/л у п'ять разів зменшує кількість клітин, що вижили, практично повністю блокує мітотичну активність клітин та у 1,5 разу збільшує кількість гіантських багатоядерних клітин у порівнянні з інтактним контролем. Водночас слід зазначити, що кількість гіантських полікаріоцитів зростає від 2,5 до 3,5 разів при інкубації клітин з іонами свинцю в поживному середовищі в концентраціях 0,01 та 0,1 мкмоль/л відповідно. Щільність клітинної популяції зменшується за цих умов удвічі. Підвищення концентрації іонів свинцю в інкубаційному середовищі практично повністю припиняє ріст та поділ клітин у культурі (рис. 2).



Численні дані літератури свідчать про те, що іонізуюча радіація (навіть у малих дозах) вражає перш за все ДНК, а також мембрани структури клітини. Солі свинцю, які діють разом з радіацією, діють як радіоміметичні речовини, посилюючи променеве ушкодження генетичного і мембраниого апарату клітин радіочутливих органів [8, 11]. Морфологічні дослідження показали, що найбільші зміни спостерігаються при одночасному



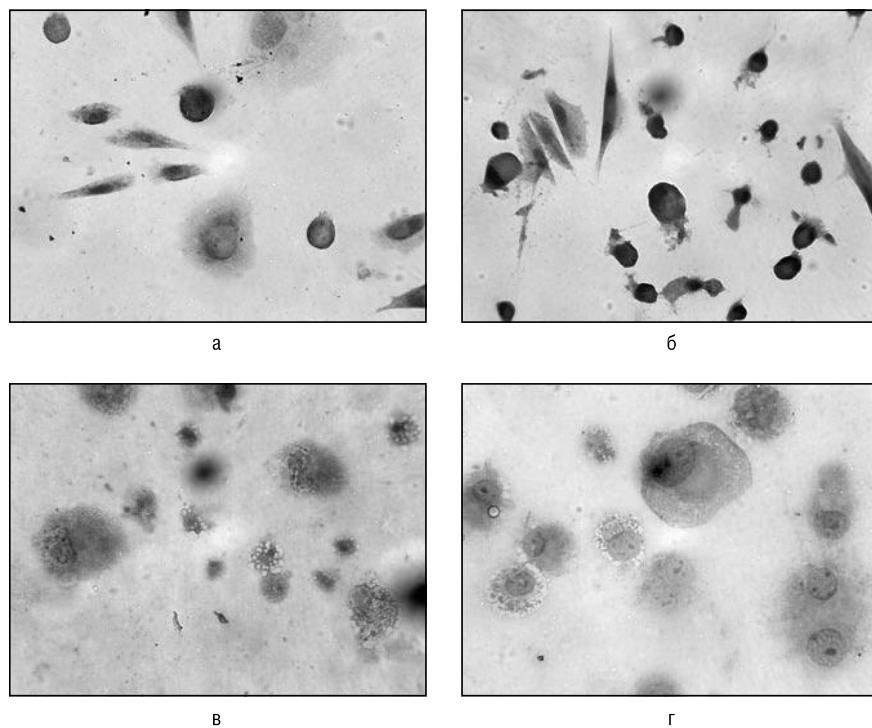
**Рис. 2.** Культура клітин лінії L<sub>929</sub> на 5-ту добу культивування в інтактному контролі (а) та при інкубації з іонами свинцю в концентрації 10 мкмоль/л (б). Щільність клітинної популяції істотно зменшена. Клітини переважно округлої форми, ядра — гіперхромні. У полі зору багато клітин з вакуолізованою цитоплазмою. Значна кількість апоптотичних клітин (зазначені стрілками). Гематоксилін-еозин, ×1000

впливі опромінення і солей свинцю (рис. 3, а і в). При цьому страждають усі функціональні системи клітини — білоксинтезуюча, енергопродукуюча і секреторна.

За показниками проліферативної та мітотичної активності в культурі клітин було встановлено (рис. 4), що клітинні реакції при додаванні іонів свинцю перед та після опромінення — різні. Дія γ-квантів <sup>60</sup>Со в присутності іонів свинцю призводить до значно істотнішого ушкодження клітин: зменшення щільності клітинної популяції, зниження мітотичного індексу та стрімкого зростання кількості гіантських багатоядерних клітин.

Тобто, спостерігається сенсибілізація клітин іонами свинцю до впливу іонізуючого випромінення. Із збільшенням дози радіації цей ефект зростає. Додавання іонів свинцю після опромінення спричиняє статистично достовірно менші ушкодження клітин (окрім дози 10 Гр) у порівнянні з попередніми ефектами. Однак слід зауважити, що і в даному випадку показники життєздатності істотно відрізнялися як від інтактного контролю, так і від окремої дії обох чинників.

Визначення кількості апоптотичних клітин в культурі показало, що іонізуюче випромінення індукує апоптоз в культурі клітин у всіх досліджуваних дозах: чим вища доза, тим більше апоптотичних клітин в культурі (рис. 5). За умов поєднаного впливу радіації та іонів свинцю залежність



**Рис. 3.** Культура клітин лінії L<sub>929</sub> на 5-ту добу культивування за умов комбінованої дії свинцю та іонізуючого випромінення: а) — опромінення в дозі 0,5 Гр в присутності іонів свинцю в концентрації 1 мкмоль/мл; б) — додавання іонів свинцю після опромінення в дозі 0,5 Гр; в) — опромінення в дозі 10 Гр в присутності іонів свинцю в концентрації 1 мкмоль/мл; г) — додавання іонів свинцю після опромінення в дозі 10 Гр. Забарвлення гематоксиліном-еозином, збільшення ×1000

кількості апоптотичних клітин в культурі від дози опромінення та від концентрації свинцю досить складна. Проте слід зазначити, що їх кількість детермінується дозою радіації за умови опромінення клітин в присутності іонів свинцю, окрім його високих концентрацій — 10 мкмоль/л (рис. 5, А) і, навпаки, впливом іонів свинцю при додаванні їх після опромінення (рис. 4, Б), окрім сублетальної дози опромінення — 10 Гр.

Нікель, на відміну від свинцю, належить до ультрамікроелементів. В 70-х роках минулого століття були отримані прямі докази необхідності

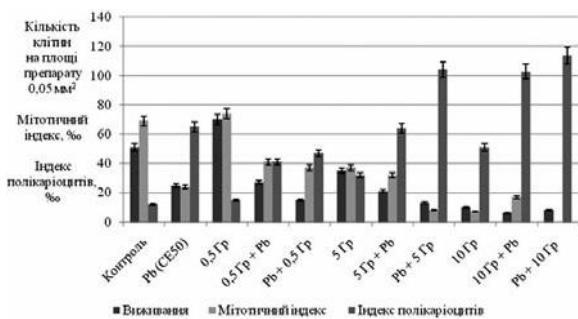


Рис. 4. Показники життєздатності клітин лінії L<sub>929</sub> (проліферативна, мітотична активність та кількість гіантських багатоядерних клітин) за умов комбінованого впливу іонізуючого випромінення та іонів свинцю в концентрації СЕ 50 (0,1 мкмоль/л), які додавали перед та після опромінення

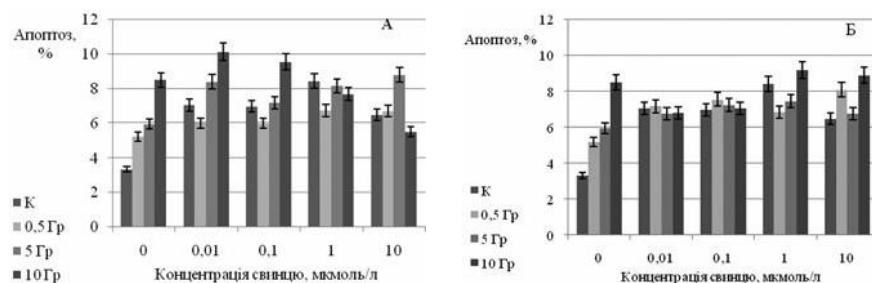


Рис. 5. Апоптоз в культурі клітин лінії L<sub>929</sub> за умов комбінованого впливу іонізуючого випромінення в дозах 0,5, 5 та 10 Гр та іонів свинцю в діапазоні концентрацій 0,01–10 мкмоль/л, які додавали перед (А) та після (Б) опромінення  $\gamma$ -квантами  $^{60}\text{Co}$

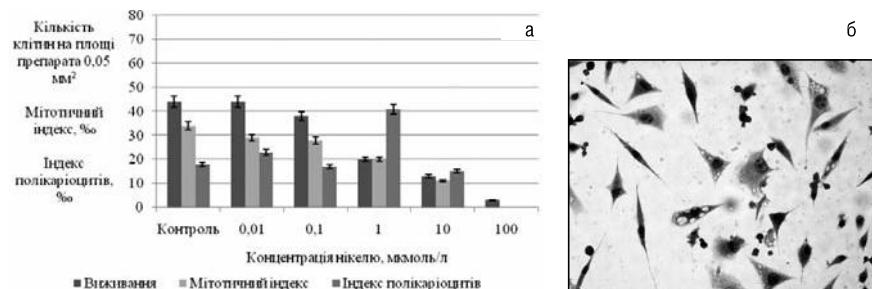
нікелю для нормального розвитку організму: в період ембріогенезу він концентрується в органах та тканинах, в яких відбуваються активні обмінні процеси. Водночас доказано, що  $\text{Ni}^{+2}$  є досить агресивним мутагенним, канцерогенним та токсичним фактором [12, 13]. Водорозчинні солі нікелю проникають в ядро та індукують утворення вільних радикалів, які пошкоджують ДНК. Показано, що низькі концентрації ацетату нікелю (від 0,1 до 100 мкмоль) в комбінації з  $\gamma$ -випроміненням викликали появу великої кількості хромосомних aberracій в лімфоцитах [14]. Збільшення концентрації нікелю до 1000 мкмоль значно зменшує цей ефект. Вважають, що  $\text{Ni}^{+2}$  порушує стабільність процесів

репарації ДНК і проявляє канцеротоксичність. Нікель виявляють в РНК, вважаючи, що він забезпечує певну структуру нуклеїнової кислоти, змінюючи хімічні властивості РНК і нуклеопротеїнів. Нікель пролонгує дію інсулулу, виявляє антагонізм по відношенню до адреналіну, зменшуючи його супресорний ефект. Цей елемент впливає на окислення аскорбінової кислоти, прискорює перехід сульфгідрильних груп у дисульфідні [15].

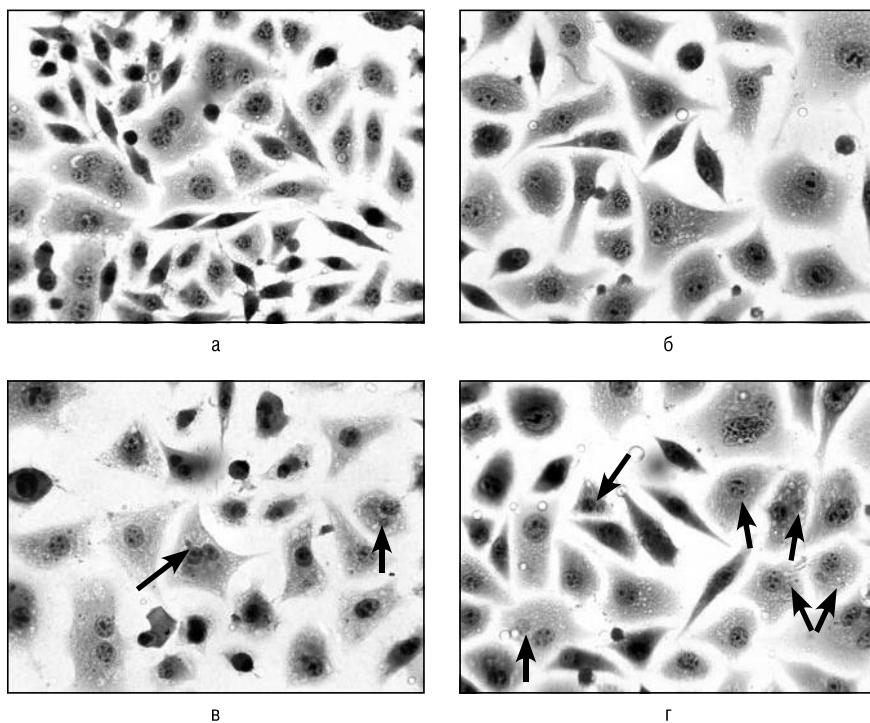
Дослідження концентраційних залежностей цитотоксичності іонів нікелю (ІІ) встановило експоненційну залежність показників життєздатності клітин (проліферативну та міtotичну активності) від концентрації катіону в поживному середовищі (рис. 6, а).

Статистично достовірне збільшення (майже вдвічі) кількості гіантських багатоядерних клітин, яке свідчить про істотні метаболічні зміни, спостерігається за концентрації іонів нікелю в поживному середовищі — 1 мкмоль/л. Подальше збільшення кількості мікроелемента призводить до інгібування проліферації та міtotичної активності клітин. При концентрації 100 мкмоль/л полікаріоцитів взагалі не спостерігали, що вказує на цитотоксичність нікелю та інші шляхи клітинної загибелі (некроз).

Дослідження комбінованої дії іонів нікелю та іонізуючого випромінення показало, що, на відміну від іонів свинцю, нікель має певний захисний вплив на клітини за умови їх опромінення в присутності іонів нікелю (рис. 7, а—г та рис. 8). Можливо в цьому випадку спостерігається феномен адаптивної відповіді клітин на дію випромінювання.



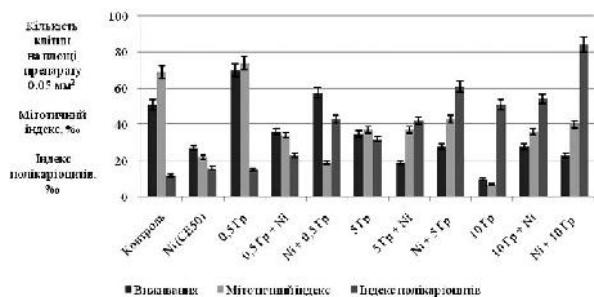
**Рис. 6.** Показники життєздатності клітин лінії L<sub>929</sub> при інкубації їх з іонами нікелю: а — проліферативна, міtotична активність та кількість гіантських багатоядерних клітин; б — клітини, інкубовані з іонами нікелю в дозі 10 мкмоль/л на 5-у добу культивування



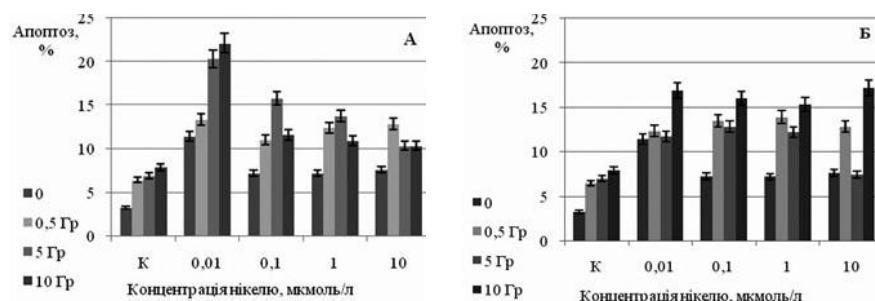
**Рис. 7.** Культура клітин лінії L929 на 5-ту добу культивування за умов комбінованої дії нікелю та іонізуючого випромінення: а — опромінення в дозі 0,5 Гр в присутності іонів нікелю в концентрації 0,1 мкмоль/мл; б — додавання іонів нікелю після опромінення в дозі 0,5 Гр; в) — опромінення в дозі 10 Гр в присутності іонів нікелю в концентрації 0,1 мкмоль/мл; г) — додавання іонів нікелю після опромінення в дозі 10 Гр. Стрілками показані клітини з мікроядрами. Гематоксилін-еозин,  $\times 1000$

Водночас привертає увагу статистично достовірне підвищення виживання та мітотичної активності клітин, опромінених в сублетальній дозі 10 Гр, при додаванні іонів нікелю як перед, так і після опромінення. Значна кількість гіантських полікаріоцитів і, зокрема, багатоядерність цих клітин (3–8 ядер) та мікроядра вказують на патологію мітозів, можливість мутагенезу, і опосередковано можуть свідчити про можливу транформацію цієї субкультури клітин.

При визначенні апоптозу в культурі клітин за умови комбінованого впливу на клітини радіації та іонів нікелю було встановлено (рис. 9, А



**Рис. 8.** Показники життєздатності клітин лінії L<sub>929</sub> (проліферативна, міtotична активність та кількість гігантських багатоядерних клітин) за умов комбінованого впливу іонізуючого випромінення та іонів нікелю в концентрації СЕ 50 (0,1 мкмоль/л), які додавали перед та після опромінення



**Рис. 9.** Апоптоз в культурі клітин лінії L<sub>929</sub> за умов комбінованого впливу іонізуючого випромінення в дозах 0,5, 5 та 10 Гр та іонів нікелю в діапазоні концентрацій 0,01–10 мкмоль/л, які додавали перед (А) та після (Б) опроміненням  $\gamma$ -квантами  $^{60}\text{Co}$

та Б), що кількість апоптотичних клітин вдвічі більша, ніж при інкубації клітин з іонами свинцю і цей ефект має аддитивний характер: відсоток апоптотичних клітин у культурі істотно зростає за поєднаної дії нікелю та радіації.

#### Висновки

- Іони свинцю мають значний токсичний вплив на клітини: за концентрації 1 мкмоль/л виживання клітин зменшується в 5 разів, в культурі переважають клітини округлої форми з гіперхромним ядром, присутні клітини з сильно вакуолізованою цитоплазмою. Істотно зростає в культурі кількість апоптотичних клітин. За умов поєднаного впливу іони свинцю сенсибілізують клітини до наступної дії IV.

2. Іони нікелю, на відміну від іонів свинцю, проявляють на порядок меншу цитотоксичність. Незначне збільшення полікаріоцитів в культурі клітин при інкубації їх тільки з іонами нікелю за умов комбінованого впливу ІВ та нікелю істотно зростає, особливо при додаванні нікелю перед опроміненням; за цих умов спостерігається досить високі показники виживання та мітотичної активності клітин.

3. Істотний модифікуючий вплив іонів нікелю особливо помітний при поєднаній дії нікелю та ІВ в дозі 10 Гр: виживання клітин збільшено в 2,5 рази, а мітотичний індекс — в 5,5 разів у порівнянні з окремою дією ІВ в дозі 10 Гр. В той же час в культурі спостерігається значна кількість клітин з мікрояздрами, що свідчить про реалізацію хромосомних aberracій в двохниткові розриви ДНК або ж про порушення процесів репарації ушкоджень. За цих умов спостерігається індукція апоптозу в культурі клітин, найвищі значення його відмічаються при опроміненні клітин в присутності іонів нікелю в концентрації 0,01 мкмоль/л та за умов додавання нікелю після опромінення в сублетальній дозі 10 Гр.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Ершов, Ю. А. Механизмы токсического действия неорганических соединений [Текст] / Ю. А. Ершов. — М.: “Медицина”, 1989. — 272 с.
2. Трахтенберг, И. М. Приоритетные аспекты проблем медицинской экологии в Украине [Текст] / И. М. Трахтенберг // Современные проблемы токсикологии. — 1998. — № 1. — С. 5–8.
3. Свинец и другие тяжелые металлы во внешней среде после Чернобыльской катастрофы (к экологической ситуации в Украине) [Текст] / И. М. Трахтенберг [и др.] // Междунар. мед. журн. — 1998. — № 3. — С. 94–98.
4. Ercal, N. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage [Text] / N. Ercal, H. Gurer-Orhan, N. Aykin-Burns // Curr. Top. Med. Chem. — 2001. — Vol. 1, № 6. — P. 529–539.
5. Valko, M. Metals, toxicity and oxidative stress [Text] / M. Valko, H. Morris, M. T. Cronin // Curr. Med. Chem. — 2005. — Vol. 12, № 10. — P. 1161–1208.
6. Сочетанное действие малых доз радиации и тяжелых металлов на регулирующие системы и репродуктивную функцию организма [Текст] / Под ред. М. И. Руднева. — К.: Наукова думка, 1994. — С. 173–191.
7. Пчеловская, С. А. Оценка неаддитивности совместного действия химического и физического факторов окружающей среды на примере модели растительной экосистемы [Текст] / С. А. Пчеловская, Ю. А. Кутлахмедов // Актуальні проблеми ботаніки та екології. — 2005. — Вип. 10 (1). — С. 255–263.
8. Мельник, М. К. Комплексний вплив на організм іонізуючого опромінення та свинцю [Текст] / М. К. Мельник // Проблеми військової охорони здоров'я: Зб. наук. пр. УВМА. — 2000. — Вип. 6. — С. 137–144.
9. L-929 (NCTC-clone929, CloneofstrainL) (Connective tissue, mouse) (21 грудня) 2009 [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://www.viromed.com/services/product/l929.htm>.
10. Животная клетка в культуре (Методы и применение в биотехнологии) [Текст] / Под общ. ред. проф. Л. П. Дьяконова. — М.: Спутник+, 2009. — 656 с.
11. Влияние свинца на развитие окислительного стресса [Текст] / И. М. Трахтенберг [и др.] // Токсикологический вестник. — 2002. — № 3. — С. 22–25.

12. Clapp, R. W. Environmental and occupational causes of cancer: new evidence 2005–2007 [Text] / R. W. Clapp, M. M. Jacobs, E. L. Loeschler // Rev. Environ. Health. — 2008. — Vol. 23(1). — P. 1–37.
13. Яковлева, М. Н. Генотоксические эффекты соединений никеля и возможности модификации никель-индуцированного мутагенеза в клетках человека [Текст] / М. Н. Яковлева, Е. В. Перминова // Токсикологический вестник. — 2007. — № 4. — С. 19–22.
14. Cavani, A. Breaking tolerance to nickel [Text] / A. Cavani // Toxicology. — 2005. — V. 209(2). — P. 119–121.
15. Human CD25<sup>+</sup> regulatory T-cells maintain immune tolerance to nickel in healthy, non-allergic individuals [Text] / A. Cavani [et al.] // J. of Immunology — 2003. — V. 171. — P. 5760–5768.

### КЛЕТОЧНЫЕ ЭФФЕКТЫ ПРИ КОМБИНИРОВАННОМ ДЕЙСТВИИ СОЛЕЙ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ И ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Г. И. Лавренчук

ГУ “Национальный научный центр радиационной медицины НАМН Украины”, г. Киев  
Проведены экспериментальные исследования клеточных реакций в условиях комбинированного действия водорастворимых соединений свинца и никеля с ионизирующим излучением в разных дозах. Цитотоксичность свинца по показателям пролиферативной и митотической активности клеток в культуре значительно выше, чем цитотоксичность никеля. Облучение клеток в присутствии ионов свинца оказывает на клетки больший повреждающий эффект, чем при добавлении его после облучения, наблюдается sensitизация клеток. Присутствие ионов никеля при облучении клеток приводит к повышению выживаемости, пролиферативной и митотической активности клеток в культуре по сравнению с действием одного никеля. Облучение в этих условиях может выступать в качестве адаптирующего фактора. Наибольший эффект наблюдается при облучении в сублетальной дозе 10 Гр. Однако инкубация клеток с ионами никеля индуцирует апоптоз в культуре в 2 раза выше, чем инкубация с ионами свинца, особенно в области низких концентраций и высоких доз облучения.

**Ключевые слова:** тяжелые металлы, ионизирующее излучение, культура клеток, выживаемость, митоз, апоптоз.

### CELLS EFFECTS UPON COMBINED INFLUENCE OF HEAVY METALS SALINS AND IONISING RADIATION

G. I. Lavrenchuk

SI “National Research Center for Radiation Medicine  
National Academy of Medical Sciences of Ukraine”, Kyiv

The experimental studies of with ionizing radiation in different doses were studied. The lead cytotoxicity by indices of cells proliferative and mitotic activity in culture was significantly higher than the cytotoxicity of nickel. Irradiating of cells in the presence of lead showed more damaging effect then when lead was added after the ionizing radiation, cells sensitisation was observed. Nickel ions presence under cells irradiation lead to viability, proliferative and mitotic activity increase comparing to action of nickel by itself. Irradiation in these conditions could play the role of adapting factor. The greatest effect was observed upon irradiation in sublethal dose of 10 Gy. However apoptosis determination in cells cultures upon combined influence of ionizing radiation and heavy metals showed that cells incubation with nickel ions induced apoptosis twice as more as while cells were incubated with lead ions, especially on range of low concentrations and high irradiation doses.

**Key words:** heavy metals, irradiation, cell culture, viability, mitosis, apoptosis.