

ОСОБЛИВОСТІ КЛІТИННИХ ЕФЕКТІВ ЗА УМОВ КОМБІНОВАНОГО ВПЛИВУ ІОНІВ НІКЕЛЮ ТА ІОНІЗУЮЧОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ

*Х.М.Литвинчук,
Г.Й.Лавренчук, Д.Д.Гапеєнко*

Державна установа «Національний науковий центр радіаційної
медицини Національної академії медичних наук України»
Київ, Україна

Проведено експериментальне дослідження цитотоксичності іонів нікелю та сполученого їх впливу з іонізуючим випромінюванням на морфофункціональні властивості клітин у культурі, яке показало істотно токсичний вплив іонів нікелю на проліферацію і мітотичну активність клітин *in vitro*, а також особливості клітинної відповіді при комбінованій дії з радіацією, які полягають у сенсibiliзації клітин іонами нікелю до подальшого опромінення в малій дозі (0,5 Гр) та зниження толерантності клітин до опромінення в сублетальній дозі (10 Гр).

Ключові слова: важкі метали, іонізуюче випромінювання, культура клітин, проліферація, апоптоз.

Вступ

Постійне зростання масштабів використання радіоактивних речовин та джерел іонізуючого випромінювання (ІВ) в різних галузях промисловості, медицині, науці збільшує вплив радіації на всі компоненти природного середовища. Поряд із цим зростає ймовірність одночасного впливу радіаційного та хімічного факторів на біологічні об'єкти, а у зв'язку із цим питання особливостей комбінованої дії різних за своєю природою факторів стає все більш актуальним. Одночасний вплив радіаційного опромінення та високих концентрацій токсичних металів, зокрема сполук нікелю, вміст яких в атмосфері великих міст досить високий, може суттєво змінити кар-

тину в порівнянні з очікуваною, якщо не враховувати нелінійність характеру взаємодії між собою цих шкідливих факторів. За останні 20 років у літературі з'явилась значна кількість повідомлень про результати експериментальних досліджень поєднаної дії важких металів (ВМ) та ІВ [1-9]. Найчастіше зустрічаються дані про те, що комбінована дія радіаційного та хімічного чинників зумовлює підсилення негативного їх впливу на об'єкти в порівнянні з окремими впливами кожного з них [2, 3, 5-9]. На разі було показано, що при тривалому впливі іонізуючої радіації низької інтенсивності і сполук ВМ на тлі посилення вільнорадикальних процесів відбувається розбалансування ферментативного захисту клітини. Порушення нормальної життєдіяльності клітин обумовлює дисфункцію органів, а в ряді випадків — поява новоутворень.

В останні десятиріччя для вивчення різних аспектів дії хімічних речовин на клітинні та субклітинні структури все ширше використовуються клітини *in vitro* [10]. Переваги цієї моделі в можливості вивчення прямого впливу хімічного агента на клітину незалежно від тканинних чи органних взаємодій і регуляторного впливу нервової та ендокринної систем.

Метою дослідження було вивчити в тест-системі культури клітин цитотоксичність іонів нікелю та встановити особливості клітинних реакцій при комбінованій дії іонів нікелю та іонізуючого випромінювання.

Матеріали та методи дослідження

Дослідження виконані на перещеплюваній культурі клітин (фібробласти мишей С3Н, трансформовані метилхолантреном) — лінія L₉₂₉ (клітинний цикл у середньому 24 год.) [11]. Культивування клітин здійснювали в поживному середовищі такого складу: середовища RPMI-1640 (90%), ембріональна теляча сироватка (10%) та антибіотики згідно зі стандартними методами роботи з клітинними штамами [12]. Опромінення клітин здійснювали через 24 год. після посадки на апараті «Тератрон» (Росія) (джерело — ⁶⁰Со з енергією -квантів 1,2 МеВ, потужність експозиційної дози 4,3×10⁻⁴ Кл/(кг·с), відстань до об'єкта 80 см, дози опромінення 0,5; 5,0 та 10,0 Гр). У дослідженнях була використана водорозчинна сіль ацетату нікелю (Ni(CH₃COO)₂). Контролем на ацетат-аніон був ацетат натрію (NaCH₃COO). Метал додавали в культуральне середовище за 1 год. перед опроміненням у кінцевій концентрації: 10, 1, 0,1, 0,01

мкмоль/л. Культивування клітин здійснювали упродовж 5 діб. Морфофункціональні характеристики клітин у культурі визначали в різних термінах культивування. Проліферативну активність клітин оцінювали за кінетикою росту. Під оптичним мікроскопом «Axioscop» (West Germany) при збільшенні в 1000 разів у межах сітки площею 0,05 мм² підраховували загальну кількість клітин, кількість мітозів і кількість гігантських багатоядерних (2 і більше ядер) клітин. Одноразово визначали кількість апоптотичних клітин. Аналіз проводили на протоковому цитофлуориметрі «FACStar Plus» фірми «Becton Dickinson» (США).

Експериментальні дані обробляли загальноприйнятими статистичними методами з використанням t-критерію Стьюдента та за допомогою пакетів прикладних програм Microsoft Excel та Biostat.

Результати дослідження та їх обговорення

У контролі клітини лінії L₉₂₉ утворюють щільний моношар з типових фібробластоподібних клітин веретеноподібної, округлої або овальної форми. Більшість клітин має два відростки. Цитоплазми цих клітин притаманні світлі вакуолі та маленькі гранули. Ядра клітин відносно великі, зустрічаються окремі двоядерні, а також гіперхромні клітини. У полі зору спостерігаються 5-8 клітин на стадії поділу (рис. 1 А).

Дослідження кінетики росту контрольних культур клітин (рис. 1 Б) показало, що для них характерне збільшення проліферативної активності впродовж 1-4 діб культивування (фаза логарифмічного росту) з поступовим виходом на плато на 5-6 добу (фаза стаціонарного росту). У ці терміни щільність моношару клітин досить висока. Максимум мітотичної активності спостерігався на третю добу культивування (рис. 1 В). У подальшому мітотичний індекс зменшувався за рахунок контактної інгібування мітозу та конфлуентного стану культури клітин. Індекс гігантських полікаріоцитів в інтактному контролі становив 8-17% (рис. 1 Г).

Інкубація клітин з іонами нікелю в різних концентраціях (рис. 2 А, В) викликала в культурі клітин істотні зміни морфофункціональних характеристик: зменшення щільності клітинної популяції, зміну форми клітин, нерівномірний розподіл їх на скляній підложці, скупчення, зменшення кількості цитоплазми, її вакуолізація, примембранне розміщення ядер, поява значної кількості багатоядерних та апоптотичних клітин. Дослідження кінетики росту, проліфера-

тивної та мітотичної активності клітин у культурі за умов інкубації з іонами нікелю (рис. 3 А, В) показали, що при підвищенні концентрації нікелю щільність клітинної популяції різко зменшується. За даними [41, 42], одностодинна інкубація клітин з іонами нікелю в концентрації 10 мкг/мл спричиняє затримку їх в лаг-фазі та пригнічення виживання на 5-у добу культивування до 27% від контролю.

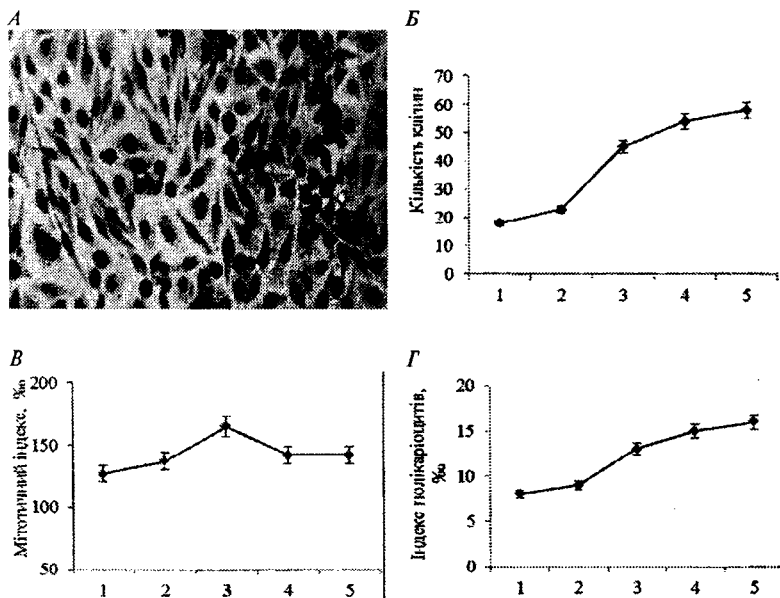


Рис. 1. Культура інтактних клітин лінії L_{929} на 5 добу культивування (А). форма клітин веретеновидна та полігональна, овальне ядро з чіткими ядерецями, значна кількість мітотичних клітин. Пофарбування гематоксилином та еозином. Збільшення $\times 1000$. Кінетика росту клітин (Б) оцінювалась за кількістю клітин на площі препарату $0,05 \text{ мм}^2$, мітотична активність (В) — за мітотичним індексом (%), кількість атипових багатоядерних клітин (Г) — за індексом полікаріоцитів (%). На осях абсцис — термін культивування клітин, доба.

На нашу думку та за даними [13, 14], нікель пошкоджує систему синтезу ДНК, РНК та затримує клітини в S-фазі поділу. На це вказує індекс полікаріоцитів: при порівняно малих концентраціях кількість полікаріоцитів істотно зростає, а при високих концентраціях загибель клітин відбувається в основному в інтерфазі, до першого поділу.

Визначена за концентраційними залежностями середньоефективна концентрація (CE50) для іонів нікелю становила $1,7 \text{ мкмоль/л}$.

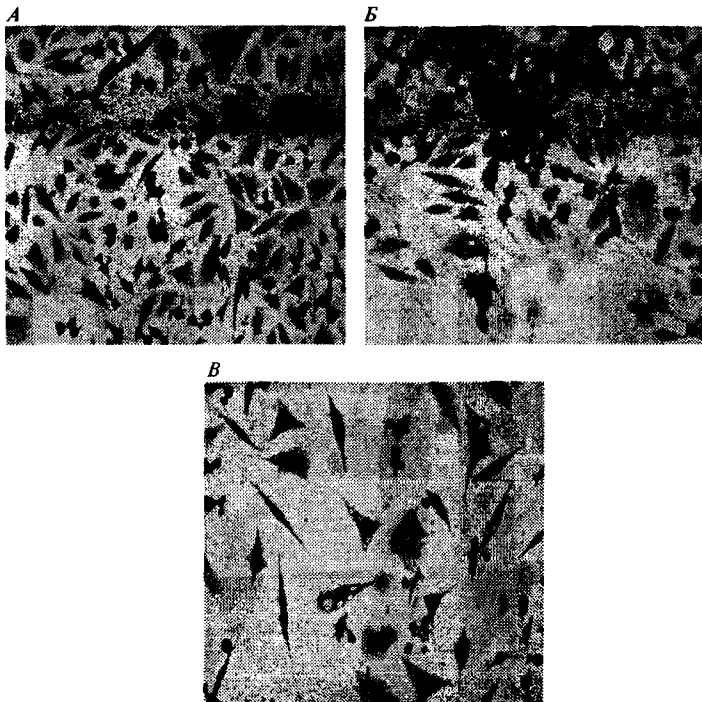


Рис. 2. Культура клітин лінії L_{929} на 5 добу культивування при інкубації з іонами нікелю в концентраціях 0,01 мкмоль/л (А), 0,1 мкмоль/л (Б), 1 мкмоль/л (В). Клітини переважно полігональної форми, рідше — веретенувидні, ядра — овальні, гіперхромні. Цитоплазма клітин в основному гомогенна, при підвищенні концентрації нікелю — вакуолізована. У полі зору 2-3 гігантські полікаріоцити з вакуолізованою цитоплазмою. Спостерігаються мітотичні та апоптотичні клітини. Забарвлення гематоксином та еозином, збільшення $\times 1000$.

Комбінована дія ІВ в малій та сублетальних дозах та іонів нікелю в різних концентраціях на життєздатність клітин наведена на рис. 4. Інкубація клітин з іонами нікелю після опромінення їх ІВ в дозі 0,5 Гр (рис. 4 А) призводить до істотного зменшення (в 1,6 разу) мітотичної активності клітин, а отже, і щільності клітинної популяції у порівнянні з окремим впливом радіації або металу. Тобто опромінення клітин у присутності іонів нікелю призводить до їх сенсibiliзації.

За умов поєднаної дії ІВ в дозі 5 Гр та іонів нікелю (рис. 4, Б) спостерігається лінійна залежність виживання клітин від концент-

рації металу. При цьому зростає кількість полікаріоцитів у культурі клітин у 2-5 разів у порівнянні з інтактним контролем.

Непередбачуваними виявились результати досліджень за умов поєданого впливу ІВ в сублетальній дозі 10 Гр та різних концентрацій іонів нікелю (рис. 4, В).

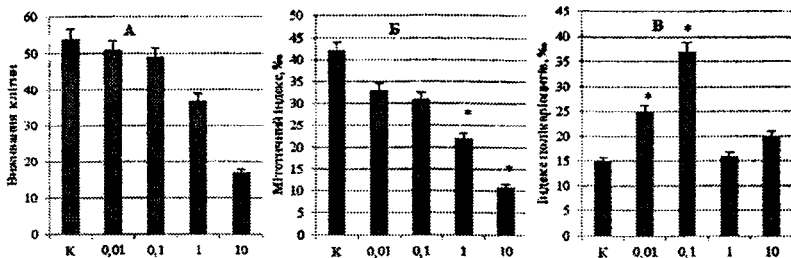


Рис. 3. Показники життєздатності клітин лінії L_{929} при інкубації їх з іонами нікелю. Вживання клітин (А) оцінювалась за кількістю клітин на площі препарату $0,05 \text{ мм}^2$, мітотична активність (Б) — за мітотичним індексом (%), кількість атипових багатоядерних клітин (В) — за індексом полікаріоцитів (%). На осях абсцис — концентрація іонів нікелю, моль/л.

Примітка: * — відмінності достовірні порівняно з контролем, $p < 0,05$.

Відомо, що опромінення клітин лінії L_{929} в дозі 10 Гр викликає 80% загибелі клітин. Додавання до клітин іонів нікелю підвищує їх виживання в 1,7-2,9 рази (у залежності від концентрації металу), і майже в 3,5 рази зростає мітотичний індекс. Водночас кількість багатоядерних клітин залишається на досить високому рівні. Згідно з даними літератури, іони нікелю затримують клітини в S-фазі мітотичного циклу. За цей час, можливо, і проходить репарація ДНК в опроміненіх у сублетальній дозі клітинах, що підвищує їх шанси на виживання.

Відомо, що основна функція апоптозу — це своєрідна клітинна селекція, тобто вилучення із популяції клітин з мутаціями чи іншими явними чи прихованими пошкодженнями.

Загальновідомо, що ІВ є індуктором апоптозу. Інкубація клітин з іонами нікелю теж підвищує кількість апоптотичних клітин у культурі (рис. 5), причому їх кількість збільшена в 3 рази при застосуванні найменшої концентрації нікелю — 0,01 мкмоль/л і в 2 рази — при всіх інших концентраціях металу.

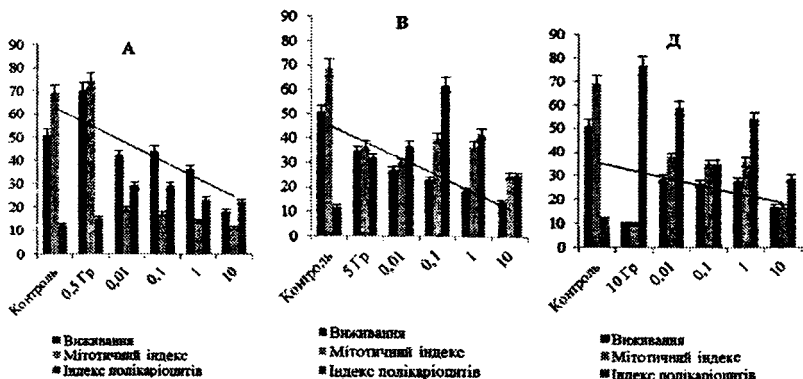


Рис. 4. Морфофункціональні зміни клітин лінії L_{929} при комбінованій дії ІВ та іонів нікелю в різних концентраціях (кмоль/л): А — після опромінення в дозі 0,5 Гр; Б — після опромінення в дозі 5 Гр; В — після опромінення в дозі 10 Гр.

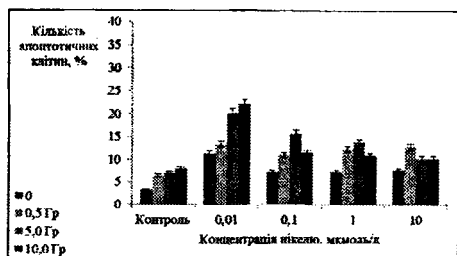


Рис. 5. Залежність кількості апоптотичних клітин у культурі клітин лінії L_{929} за комбінованого впливу ІВ в різних дозах та іонів нікелю в різних концентраціях.

При додаванні різної кількості іонів нікелю рівень апоптозу має тенденцію до зростання при опроміненні клітин ІВ в дозі 0,5 Гр та статистично достовірно ($p < 0,05$) зростає від 2 до 8 разів після опромінення клітин ІВ в дозах 5 та 10 Гр.

Висновки

Таким чином, експериментальне дослідження цитотоксичності іонів нікелю та комбінованого впливу з іонізуючим випромінюванням на клітини *in vitro* дозволило встановити істотний токсичний вплив іонів нікелю на проліферативну активність клітин та особливості клітинної відповіді при поєднаній дії з радіацією: при малих дозах радіації (0,5 Гр) спостерігали сенсibilізацію клітин іонами нікелю, а при сублетальних дозах (10 Гр) — певний радіозахист.

Література

1. Скальный А.В. Микроэлементозы человека: гигиеническая диагностика и коррекция. Микроэлементы в медицине. — М., 2000. — С. 96.
2. Trakhtenberg I. The Ecologic Consequences of the Chernobyl Disaster: Radiation And Lead / I.Trakhtenberg, N.Ivanitskaya, Yu.Talakin // *Frezenius Envir. Bull.* — 1995. — Vol. 4. — P. 597-602.
3. Мадонова Ю.Б. Хромосомные нарушения, индуцированные солями тяжелых металлов *in vitro* у населения, проживающего на территориях с повышенной радиационной нагрузкой / Ю.Б.Мадонова, В.А.Трофимов // *Успехи совр. Естествознания. Материалы конф.* — 2006. — №12. — С. 58-59.
4. Трахтенберг И.М. Токсикология в реалиях времени / И.М.Трахтенберг, Ю.Б.Виленский. — 2010. — Режим доступа: <http://health-ua.com/articles/866.html>.
5. Komarova Ludmila Ингибирование восстановления клеток после комбинированного действия различных факторов реализуется через образование необратимых повреждений. Inhibition of cell recovery after combined action of different modalities is realized through the production of irreversible damage / Ludmila n. Komarova // *Актуальные вопросы генетики, радиобиологии и радиоэкологии: 2 Чтения, посвященные памяти В.И.Корогодина и В.А.Шевченко.* — Дубна — Москва, 12-13 янв., 2009; *Материалы, тезисы, доклады.* — Дубна, 2008. — С. 66.
6. Пчеловская С.А. Оценка синергизма комбинированного действия радионуклидов и тяжелых металлов / С.А.Пчеловская, Ю.А.Кутлахмедов // *Радіобіологічні ефекти: ризики, мінімізація, прогноз. Матеріали між нар. конф.* — К., 2005. — С. 141.
7. Поєднаний вплив важких металів та іонізуючого випромінювання низької інтенсивності на рівень ферментативного антиоксидантного захисту клітин / О.В.Севериновська, А.І.Дворецкий, О.Г.Єгорова, О.Ю.Зайченко // *Зб. наук. праць. НЦРМ АМН України «Проблеми радіаційної медицини та радіобіології».* Вип. 9. — К., 2003. — С. 115-119.
8. Особливості радіаційно-індукованих ефектів в організмі експериментальних тварин в умовах поданого зовнішнього і внутрішнього опромінення в малих дозах / В.В.Талько [та ін.]; за ред. А.М.Сердюка, В.Г.Бєбешка, Д.А.Базики // *Медичні наслідки Чорнобильської катастрофи, 1986-2011.* — Тернопіль: ТДМУ, 2011. — С. 899-915.
9. Осипов А.Н. Молекулярные и цитогенетические эффекты в клетках системы крови млекопитающих при длительном воздействии низкоинтенсивного ионизирующего излучения и тяжелых металлов: Автореф. дис. ... к.биол.н. — М., 2004. — 41 с.
10. Трахтенберг І.М. Переваги методу дослідження токсичного впливу сполук важких металів у культурі клітин людини *in vitro* порівняно з традиційним методом *in vivo* на тваринах як більш достовірного та адекватного [Текст] / І.М.Трахтенберг, М.Л.Марченко, Н.О.Бєзденєжних,

- Ю.Й.Кудрявец // Сучасні проблеми токсикології. — 2010. — №23. — С. 69-72.
11. L-929 (NCTC-klone929, CloneofstrainL) (Connective tissue, mouse). — 2009. — Режим доступу: <http://www.viomed.com/services/product/1929.htm>.
 12. Дьяконов Л.П. Животная клетка в культуре: Методы и применение в биотехнологии / Под ред. проф. Л.П.Дьяконова. — М.: Спутник+, 2009. — 656 с.
 13. Яковлева М.Н., Перминова Е.В. Генотоксические эффекты соединений никеля и возможности модификации никель-индуцированного мутагенеза в клетках человека / Токсикологический вестник. — 2007. — №4. — С. 19-22.
 14. Savani A. Breaking tolerance to nickel / Toxicology. — 2005. — Vol. 209 (2). — P. 119-121.

Х.М.Литвинчук, Г.И.Лавренчук, Д.Д.Гапеенко. Особенности клеточных эффектов при комбинированном воздействии ионов никеля и ионизирующего излучения. Киев, Украина.

Ключевые слова: тяжелые металлы, ионизирующее излучение, культура клеток, пролиферация, апоптоз.

*Проведено экспериментальное исследование цитотоксичности ионов никеля и сочетанного их воздействия с ионизирующим излучением на морфофункциональные свойства клеток в культуре, которое показало существенное токсическое влияние ионов никеля на пролиферацию и митотическую активность клеток *in vitro*, а также особенности клеточного ответа при комбинированном действии с радиацией, которые заключаются в сенсibilизации клеток ионами никеля к последующему облучению в малой дозе (0,5 Гр) и понижению толерантности клеток к облучению в сублетальной дозе (10 Гр).*

Ch.M.Lytvynchuk, H.I.Lavrenchuk, D.D.Gapeenko. Particular qualities of effects on cells at the combined influence of nickel ions and the ionizing radiation. Kyiv, Ukraine.

Key words: heavy metals, ionizing radiation, cell culture, proliferation, apoptosis.

*There was conducted an experimental research of the cytotoxicity of nickel ions and the combined effects of ionizing radiation on the morpho-functional properties of the biocytoculture. The research showed that nickel ions have significant toxic effect on the proliferation and mitotic activity of the cells *in vitro*, as well as some features of the cells response at the combined radiation effect which is sensibilization of cells for the following low dose radiation (0,5 Gy) by the nickel ions and decrease of cell tolerance of radiation in a sublethal dose (10 Gy).*