

Життєздатність клітин у культурі при спільній дії важких металів та радіації

Т. М. Дудченко, Г. Й. Лавренчук, Я. І. Серкіз, В. А. Зінченко¹

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України
Вул. Васильківська, 45, Київ, 03022, Україна

¹ Інститут онкології і радіології МОЗ України
Вул. Ломоносова, 33/43, Київ, 03022, Україна

Спільна дія радіації в дозі ЛД-10 та важких металів при EC₅₀ спричинює зміни показників життєздатності клітин у культурі, які є специфічними щодо впливу металів та характерними для різних стадій росту клітин. Cr і Pb спільно із радіацією проявляють синергічну або адитивну дію, Cu — антагоністичний ефект, Pb і Ba в стаціонарній фазі росту культури клітин збільшують мітотичний індекс та кількість полікаріоцитів.

Вступ. Питання спільної дії радіації та інших чинників довкілля природного та техногенного походження є актуальним у зв'язку з негативним впливом їх на біоту [1—3]. Численні літературні дані вказують також на причинно-наслідкові патогенетичні зміни в організмах людини та тварин, ініційовані спільною дією різних фізичних та хімічних факторів [2—5]. Однак на сьогоднішній день характер потенціювання біологічних ефектів від впливу декількох чинників вивчено недостатньо. Існуючі дані експериментальних досліджень є неоднозначними, часто суперечливими, не встановлено динаміки та дозових залежностей ефектів, не запропоновано прийнятних науково обґрунтованих механізмів їхнього формування.

Таким чином, доцільним видається подальше поглиблене вивчення ефектів впливу чинників різної природи.

Одним із найефективніших та поширеніших екзогенних чинників є радіація та важкі метали як продукти техногенної діяльності людини. Механізми взаємодії металів із живими системами, що в основному реалізуються на рівні мембранних комплексів, на сьогодні відомі [6—10]. Природа радіо-генних порушень в області малих доз радіації теж, очевидно, пов'язана зі змінами клітинного метаболізму, що детерміновані структурно-функціона-

льними коливаннями, в першу чергу, найчутливіших мембранних компонент [1—5, 11]. Характер потенціювання ефектів спільної дії радіації та металів (адитивність, синергізм чи антагонізм) на сьогоднішній день залишається невизначеним.

Метою даної роботи було дослідження показників життєздатності клітин *in vitro* в умовах спільної дії рентгенівського випромінювання (РВ) та важких металів (ВМ).

Матеріали і методи. Дослідження виконано на асинхронній культурі трансформованих метилолантронем фібробластів миші *L₉₂₉*, культивування яких здійснювали у поживному середовищі Ігла з додаванням 10 %-ї ембріональної сироватки та гентаміцину згідно зі стандартними методами роботи з культуральними штамми [12].

Клітини вирощували на покривних скельцях розміром 18 × 9 мм та розсівали у кількості (5—10) · 10⁴ кл/мл. Цитотоксичну дію міді, барію, нікелю, хрому та свинцю вивчали при середньоефективних концентраціях EC₅₀, визначених нами раніше [13]. Метали були у вигляді водорозчинних солей (CuCl₂ · 2H₂O; (CH₃COO)₂Pb · 3H₂O; BaCl₂; NiCl₂; CrO₃). Клітини з розчинами солей важких металів опромінювали рентгенівськими променями на установці РУМ-17 за умов: напруга — 180 кВ, сила струму — 5 мА, фільтри — 0,5 мм Cu + 1,0 мм Al, відстань — 40 см, потужність експозиційної дози — 0,12 мА · кг⁻¹.

© Т. М. ДУДЧЕНКО, Г. Й. ЛАВРЕНЧУК, Я. І. СЕРКІЗ,
В. А. ЗІНЧЕНКО, 2000

Поглинута доза для клітин складала 1,0 Гр, що викликає 10 %-ву загибель клітин. Процедура впливу ВМ та РВ на клітини була наступною: клітини протягом 30 хв знаходилися у середовищі з ВМ, 4 хв — експонувалися з РВ за відсутності ВМ та 60 хв — продовжували перебувати в умовах дії з ВМ. У подальшому клітини ретельно відмивали чистим середовищем, додавали чисте підігріте до температури 37 °С поживне середовище, в якому продовжували культивування терміном до 5 діб. Паралельно культивували клітини, опромінені лише РВ та без добавок ВМ (контроль). На 1, 2, 3, 4 і 5-ту добу культивування моношар клітин фіксували на покривному скельці 96° етанолом та забарвлювали гематоксилін-еозинном. Аналізували криві росту клітин у моношарових культурах за щільністю їх на площі 0,05 мм², визначали мітотичний індекс (МІ) та індекс гігантських багатоядерних клітин. Статистичну обробку результатів виконували за критерієм Ст'юдента.

Результати та обговорення. Кінетика росту (рис. 1) контрольних клітин протягом чотирьох діб культивування являє собою прямо пропорційну лінійну залежність із подальшою (5-та доба) тенденцією до виходу на плато. Опромінення клітин РВ зменшує коефіцієнт пропорційності, вказуючи на зниження їхнього виживання та пригнічення росту. Із вивчених важких металів тільки Сu проявляє стимулюючу дію на 2-гу добу культивування відносно контрольних та опромінених клітин, а також на 4-ту і 5-ту — відносно опромінених.

Поєднана дія випромінювання та інших важких металів призводить до характерних кривих росту клітин, що мають специфічні особливості. Так, дія Сг та Ні пригнічує виживання клітин у ранні (1—2 доби), Рb, Ні та Ва — у пізні (4—5 діб) терміни культивування.

Характерні зміни мітотичного індексу (рис. 2) свідчать про радіаційне пригнічення поділу клітин за весь час культивування. Спільна дія РВ та ВМ характеризується складною кінетикою процесу. На першу добу культивування Сu і Ва проявляють позитивний антагоністичний ефект із РВ (стимулюють поділ клітин), Сг, Рb і Ні — синергічний, посилюючи вплив радіаційного фактора. На 4-ту і 5-ту добу культивування характер потенціювання ефектів, за виключенням Ні, зберігається. Слід відмітити, що поєднана дія РВ та групи ВМ (Рb, Сu і Ва) призводить до коливальних змін МІ протягом культивування клітин.

Особливістю спільної дії РВ та ВМ є також поява на препаратах культур значної кількості патологічних мітозів (триполосних), що може бути причиною появи полікаріотів. Коливальні зміни

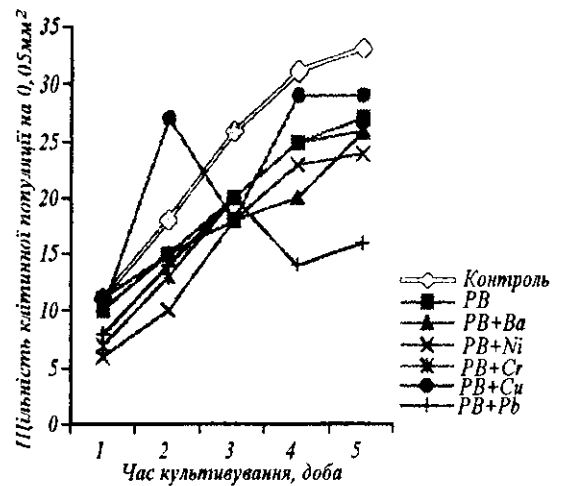


Рис. 1. Кінетика росту L-клітин у культурі при спільній дії важких металів (ВМ) та рентгенівського випромінювання (РВ)

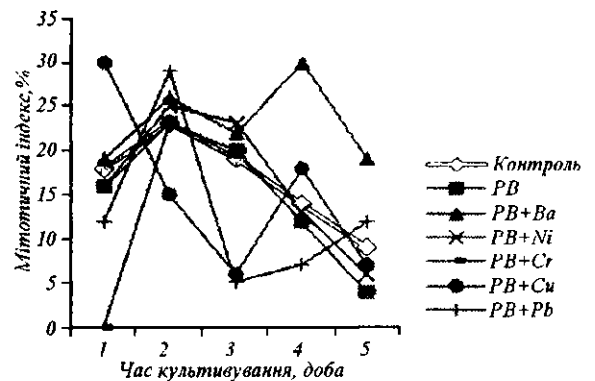


Рис. 2. Зміна мітотичного індексу L-клітин у культурі при спільній дії важких металів (ВМ) та рентгенівського випромінювання (РВ)

МІ в процесі культивування за умов попереднього комбінованого впливу РВ та окремих ВМ може свідчити про синхронізацію поділу клітин.

Динаміку утворення гігантських багатоядерних клітин, які спостерігаються при одночасній дії РВ та ВМ, наведено на рис. 3. Як правило, кількість їх у популяціях неопромінених клітин є стабільною і

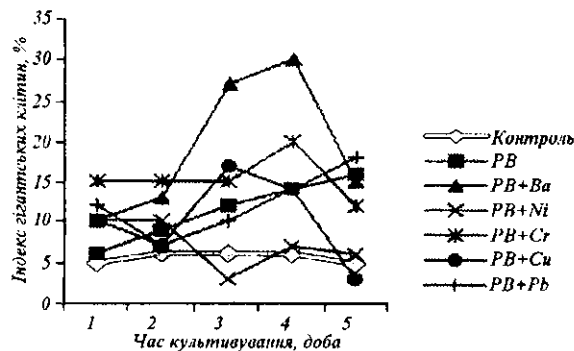


Рис. 3. Зміна індексу гігантських клітин у культурі L-клітин при спільній дії важких металів (ВМ) та рентгенівського випромінювання (РВ)

не залежить від часу культивування. РВ призводить до лінійного збільшення кількості багатоядерних клітин. Присутність ВМ у різній мірі впливає на динаміку утворення гігантських клітин. Так, Cu та Ni проявляють антагоністичну дію по відношенню до впливу РВ, яка виражається в істотному захисному ефекті на 1-шу добу та нормалізуючому — на 5-ту добу культивування. Рb, Cu та Cr разом з РВ на 1, 3 та 4-ту добу проявляють адитивні або синергічні ефекти. Для Ва, Cr та Cu вирізняється крива з максимумом, що припадає на 3-тю або 4-ту добу культивування. Згадані ВМ різко знижують ефективність утворення гігантських клітин на 5-ту добу культивування. Характерною особливістю спільної дії РВ та ВМ є те, що, за винятком Рb, всі інші з вивчених металів проявляють максимум своєї активності, який приходить на різні терміни культивування.

Висновки. Сумарна дія ВМ та РВ причинно обумовлює складну кінетику зміни показників життєздатності L-клітин у культурі, яка є характерною для різних стадій росту клітини. Cu і Рb, як правило, призводять до коливального характеру змін показників МІ та щільності клітинної популяції; радіогенні зміни показників, викликаних іншими ВМ, проявляють залежність з максимумом ефекту.

Важкі метали Cr і Рb разом із РВ на стадії інтенсивного росту проявляють адитивну або синергічну дію, знижуючи ріст клітинної популяції і митотичний індекс та збільшуючи кількість гігант-

ських клітин, Cu — призводить до протилежного ефекту.

У стаціонарній стадії росту клітин Рb і Ва викликають збільшення МІ відносно контролю та дії лише РВ, одночасно вказані елементи призводять до формування найбільшої кількості гігантських клітин в культурі.

Т. Н. Дудченко, Г. І. Лавренчук, Я. І. Серкіз, В. А. Зинченко

Жизнеспособность клеток в культуре при совместном действии тяжелых металлов и радиации

Резюме

Исследовано совместное действие тяжелых металлов (Pb, Ba, Cr, Ni, Cu) в среднеэффективных концентрациях EC_{50} и рентгеновского излучения в дозе ЛД-10 на показатели жизнеспособности L-клеток в культуре. Кинетические изменения показателей специфичны для разных элементов и зависят от стадии роста клеток. Показано, что Cr и Pb совместно с радиацией на стадии интенсивного роста клеток проявляют синергическое или аддитивное действие — понижают рост клеточной популяции, митотический индекс и увеличивают количество гигантских клеток. Cu вызывает противоположный эффект. В стационарной фазе роста действие Pb и Ba приводит к возрастанию митотического индекса и количества гигантских клеток.

T. N. Dudchenko, G. I. Lavrenchuk, Ya. I. Serkiz, V. A. Zinchenko

Vitality of cells in culture after combined exposure to heavy metals and radiation

Summary

Combined influence of middleeffective concentrations of heavy metals (Pb, Ba, Cr, Ni, Cu) and irradiation by X-rays in LD-50 dose on the indices of vitality of L-cells in culture has been investigated. Kinetic changes of indices are specific for different elements and depend on the level of cellular growth. It was shown that combined exposure to Cr, Pb and radiation on the level of intense cellular growth manifested synergic or adaptative influence (it decreased growth of cells population, the mitotic index and increased the number of gigantic cells). Cu causes the contrary effect. Pb and Ba increase the mitotic index and the number of gigantic cells on the stationary growth level.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Спитковський Д. М. Концепція діяння малих доз іонізуючих випромінювань на клітки і її можливі наслідки // Радиобиологія. — 1992. — 32, № 2. — С. 382—400.
2. Serkiz Ya. I., Pintschuk V. G., Pintschuk L. B., Druzina N. O., Puchova G. G. Tschernobyl und seine Folgen. Radiobiologische Aspekte der Tschernobyler Katastrophe. — Elbe: DNJEPR, 1994. — Band 1. — 212 p.
3. Бурлакова Е. Б., Голощанов А. Н., Горбунова Н. В., Гуревич С. М., Жижина Г. П., Козаченко А. И., Конрадов А. А., Корман Д. Б., Молочкина Е. М., Наглер Л. Г., Озерова И. Б., Скалацкая С. И., Смотряева М. И., Тарасенко О. А., Треценкова Ю. А., Шевченко В. А. Особенности биологического действия малых доз облучения // Радиационная биология. Радиозэкология. — 1996. — 32, № 4. — С. 610—631.

4. Медведь С. Ю., Теличко Ф. Ф., Геден В. Ф. Распределение поглощения энергии ионизирующего излучения по микроструктурам биосистем // Радиационная биология. Радиоэкология.—1997.—37, № 5.—С. 727—734.
5. Барабой В. А., Танцюра Т. В., Коваленко Л. С., Зінченко В. А., Лавренчук Г. Й. Морфометрична характеристика культури клітин L₉₂₉ після термічного та радіаційного впливу // Біополімери і клітка.—1999.—15, № 1.—С. 1—4.
6. *Handbook on the Toxicology of Metals* // Eds L. Friberg, G. F. Nordberg, V. V. Vourek.—Amsterdam: Elsevier, 1979.—687 p.
7. Максимчук Т. Т., Бабенко Т. А. Особенности генотоксического и канцерогенного действия металлов // Эксперим. онкология.—1990.—12, № 4.—С. 3—9.
8. Serkiz Ya., Pinchuk V., Drushina N. Chemiluminescence of irradiated animal blood plasma // J. Bioluminescence and chemiluminescence.—1990.—5.—P. 1310—1313.
9. Liu D., Jiang W., Wang W., Zhai L. Evaluation of metal ion toxicity on root tip cells by the *Allium* test // Israel J. Plant Sci.—1995.—43.—P. 125—133.
10. Довгальок А. І., Каменяк Т. Б., Блюм Я. Б. Токсична дія металів на ріст та мітотичну активність клітин коренів цибулі *Allium cepa* L. // Доп. НАН України.—1998.—№ 6.—С. 173—177.
11. Богомазов М. Я. Влияние общего рентгеновского облучения на всасывание некоторых металлов из ЖКТ в зависимости от степени их окисления // Гигиена и санитария.—1990.—№ 9.—С. 59—61.
12. Адамс Р. Методы культуры клеток для биохимиков.—М.: Мир, 1983.—385 с.
13. Дудченко Т. М., Лавренчук Г. Й., Набока М. В., Серкіз Я. І., Чеботарьов Є. Ю. Цитотоксичний вплив важких металів на культуру L-клітин // Цитологія і генетика.—2000.—34, № 3.—С. 32—37.

УДК 614.876:57.042:576.535
Надійшла до редакції 10.04.2000