

ВПЛИВ КОМБІНОВАНОЇ ДІЇ ^{137}Cs ТА ВАЖКИХ МЕТАЛІВ НА ПОКАЗНИКИ ЖИТТЄЗДАТНОСТІ L_{929} -КЛІТИН У КУЛЬТУРІ**Т. М. Дудченко, Г. Й. Лавренчук, Я. І. Серкіз***Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології
ім. Р. Є. Кавецького НАН України, Київ*

Вивчено залежність зміни показників життєздатності клітин лінії L_{929} *in vitro*, що зазнали комбінованого впливу різних концентрацій важких металів та радіонуклідів цезію. Встановлено, що барій, нікель та хром збільшують сорбцію $^{137}\text{Cs}^+$ клітинами. Свинець та мідь інгібують цей процес. При комбінованій дії Ni^{2+} з $^{137}\text{Cs}^+$ та Pb^{2+} з $^{137}\text{Cs}^+$ спостерігали адитивний ефект. Показано, що при комбінованій дії Cr^{6+} та $^{137}\text{Cs}^+$ ефект сумісної дії не проявляється.

Вступ

У природних екосистемах сумісно діє комплекс фізичних і хімічних факторів, вплив яких на біоту з кожним роком збільшується. Після Чорнобильської катастрофи особливо гострою постала проблема забруднення навколишнього середовища. Це викликано тим, що до хімічних забруднювачів техногенного походження внаслідок аварії додався радіаційний. Крім того, в гострий аварійний період у жерло реактора було скинуто значну кількість свинцю, що призвело до комбінованого радіаційно-хімічного забруднення значних територій [1]. Тому особливий інтерес являє собою вивчення ступеня токсичності різних металів у сукупності з радіаційноушкоджуючим агентом.

Важкі метали є одним із багатьох потенційно шкідливих факторів довкілля. Відома їх загальна токсичність [2, 3] і канцерогенність [4]. Показано, що свинець [5 - 7] та інші метали спричиняють порушення процесів мітозу, пошкоджують структуру ДНК та хроматину [5, 8 - 10]. Відомо, що нікель здатний підвищувати або пригнічувати активність деяких ферментів як *in vivo*, так і *in vitro* [11], а кадмій - ушкоджувати ДНК *in vitro* й спричиняти хромосомний мутагенез *in vivo* [12]. Згідно гіпотез про механізми генотоксичності [13], метали при прямій дії безпосередньо взаємодіють із ДНК, з її нуклеофільними центрами [14, 15], індукуючи одониткові розриви ДНК, зшивки ДНК-білок тощо [16]. З іншого боку, одним із механізмів дії важких металів є розгалудження ланцюгів окислення та утворення вільнорадикальних сполук [8, 17], що викликають стимуляцію перекисного окислення ліпідів [18].

За сучасними уявленнями ушкодження біологічно важливих структур клітини при дії іонізуючого випромінювання може бути реалізовано двома шляхами. У першому випадку електрони, утворені в процесі розміну енергії, як правило, призводять до розриву молекулярних зв'язків тієї структури, яка є мішенню. Завдяки цьому виникають одно- й двохниткові розриви молекул ДНК, які з певною ймовірністю детермінують незворотні ушкодження в геномі клітини.

Але за певних обставин більш шкідливим на одиницю поглинутої дози може виявитись другий шлях взаємодії іонізуючої радіації з живими системами, при якому ушкодження біологічних структур відбувається за рахунок дуже реакційноздатних хімічних агентів, що утворюються в місцях обміну енергії [19]. Серед таких умов може бути тривала дія випромінювань низької інтенсивності, щільно іонізуюче випромінювання радіонуклідів тощо.

Радіація індукує в клітинах ссавців порушення біохімічних процесів, ушкоджує важливі для життя клітини макромолекули. Ці пошкодження в подальшому реалізуються в мутаціях, хромосомних абераціях, неопластичній трансформації, а також у загибелі клітин [20, 21].

Проблема комбінованої дії металів та радіації на біологічні об'єкти до цього часу залишається маловивченою. Незважаючи на значну кількість наукових досліджень, присвя-

чених вивченню впливу кожного з цих факторів окремо, інформація про сумісну дію радіації та важких металів розрізнена й висвітлює лише окремі аспекти проблеми [12, 22 - 25].

Метою роботи було дослідження життєздатності клітин лінії L₉₂₉ за умов сумісної дії ¹³⁷Cs⁺ та іонів важких металів.

Матеріали та методи

Експериментальні дослідження виконано на асинхронній культурі клітин лінії L₉₂₉ (трансформовані метилхолантреном фібробласти мишей), які культивували у поживному середовищі Ігла з додаванням 10 % телячої ембріональної сироватки та гентаміцину згідно із стандартними методами роботи з культуральними штабами [26].

Клітини в кількості 5 - 10 · 10⁴ кл/мл вирощували на покривних скельцях розміром 18 × 9 мм. Через 1 год після посадки в культуральне середовище додавали водні розчини солей важких металів (CuCl₂ · 2H₂O, BaCl₂, NiCl₂, CrO₃, (CH₃COO)₂Pb · 3H₂O) у середньо-ефективних концентраціях, визначених раніше [27]. Сумісно із солями вищевказаних металів до поживного середовища додавали радіонукліди ¹³⁷Cs у вигляді водного розчину CsCl питомою активністю 3,6 МБк/мл, яка при експозиції 1 год формувала поглинуту дозу іонізуючої радіації 1 Гр. Через годину розчини відбирали, проби ретельно відмивали середовищем без металів та радіонуклідів, додавали підігріте до температури 37 °С поживне середовище, в якому культивували клітини впродовж 5 діб. Паралельно культивували клітини з додаванням тільки ¹³⁷Cs⁺ та без будь-яких домішок (інтактний контроль). Кожну добу клітини фіксували 96⁰ етанолом та фарбували гематоксилін-еозин. Всього було досліджено 504 культури клітин.

Життєздатність оцінювали за тестами виживання клітин у моношарових культурах та мітотичній активності. Додатково на препаратах контрольних та дослідних культур визначали індекс гігантських багатоядерних клітин, які є маркерами неспецифічної реакції L₉₂₉-клітин при дії екзогенних факторів різної природи. Статистичну обробку експериментальних даних проводили за методом Стьюдента.

Сорбційну здатність ¹³⁷Cs⁺ клітинами оцінювали за потужністю експозиційної дози (мкР/год). Виміри проводили дозиметром ДБГ-01Н при фіксованій геометрії, однаковій кількості клітин та ідентичних усіх інших умовах.

Результати досліджень та їх обговорення

Результати експериментальних досліджень сорбційної здатності клітинами ¹³⁷Cs⁺, а також ¹³⁷Cs⁺ у присутності іонів важких металів подано в таблиці, з якої видно, що Ba²⁺ достовірно збільшує акумуляцію ¹³⁷Cs⁺ клітинами. При дії інших металів спостерігається тенденція до збільшення (Ni²⁺, Cr⁶⁺) або зменшення (Cu²⁺, Pb²⁺) поглинання радіонуклідів цезію клітинами.

Сорбція клітинами лінії L₉₂₉ ¹³⁷Cs при його сумісній дії з іонами важких металів

Варіанти дослідів	¹³⁷ Cs ⁺	¹³⁷ Cs ⁺ + Ba ²⁺	¹³⁷ Cs ⁺ + Ni ²⁺	¹³⁷ Cs ⁺ + Cr ⁶⁺	¹³⁷ Cs ⁺ + Cu ²⁺	¹³⁷ Cs ⁺ + Pb ²⁺
Потужність дози, мкР/год	8.0 ± 1.1	13.4 ± 1.9*	9.6 ± 1.7	9.4 ± 1.2	7.2 ± 1.6	6.8 ± 2.1

* Різниця з контролем (радіонукліди ¹³⁷Cs⁺) достовірна (p < 0.05).

Результати дослідження проліферації L₉₂₉-клітин за характером кривих росту та мітотичною активністю наведено на рис. 1 і 2. Видно, що сумісна дія ¹³⁷Cs⁺ та іонів металів зменшувала виживання клітин у моношарових культурах відносно контролю. Найбільше пригнічення росту та поділу клітин спостерігали при сумісній дії Ni²⁺ і ¹³⁷Cs⁺, а також Pb²⁺ і

$^{137}\text{Cs}^+$ (для цих груп характерний адитивний ефект), у той час як спільна дія Cr^{6+} і $^{137}\text{Cs}^+$ не впливала на виживання клітин у моношарових культурах порівняно з дією одного Cr^{6+} . Проміжне положення займають групи Ba^{2+} і $^{137}\text{Cs}^+$ та Cu^{2+} і $^{137}\text{Cs}^+$, де виживання клітин зменшується на 8 % порівняно з дією тільки самих металів (див. рис. 1).

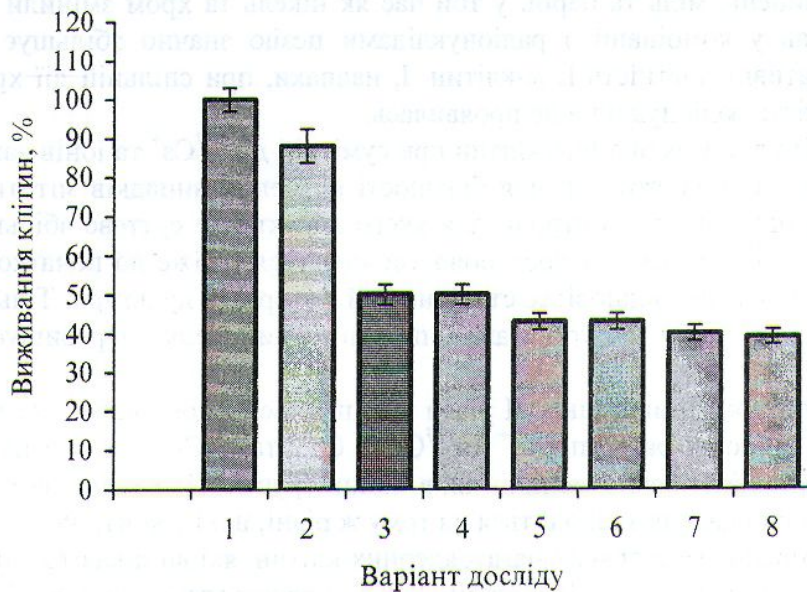


Рис. 1. Вживання L_{929} -клітин у культурі при інкубації з радіонуклідом $^{137}\text{Cs}^+$ та при сумісній дії $^{137}\text{Cs}^+$ із важкими металами: 1 - контроль; 2 - інкубація з $^{137}\text{Cs}^+$; 3 - інкубація з важкими металами в ефективних концентраціях (EC_{50}); 4 - спільна дія Cr^{6+} та $^{137}\text{Cs}^+$; 5 - Cu^{2+} та $^{137}\text{Cs}^+$; 6 - Ba^{2+} та $^{137}\text{Cs}^+$; 7 - b^{2+} та $^{137}\text{Cs}^+$; 8 - Ni^{2+} та $^{137}\text{Cs}^+$.

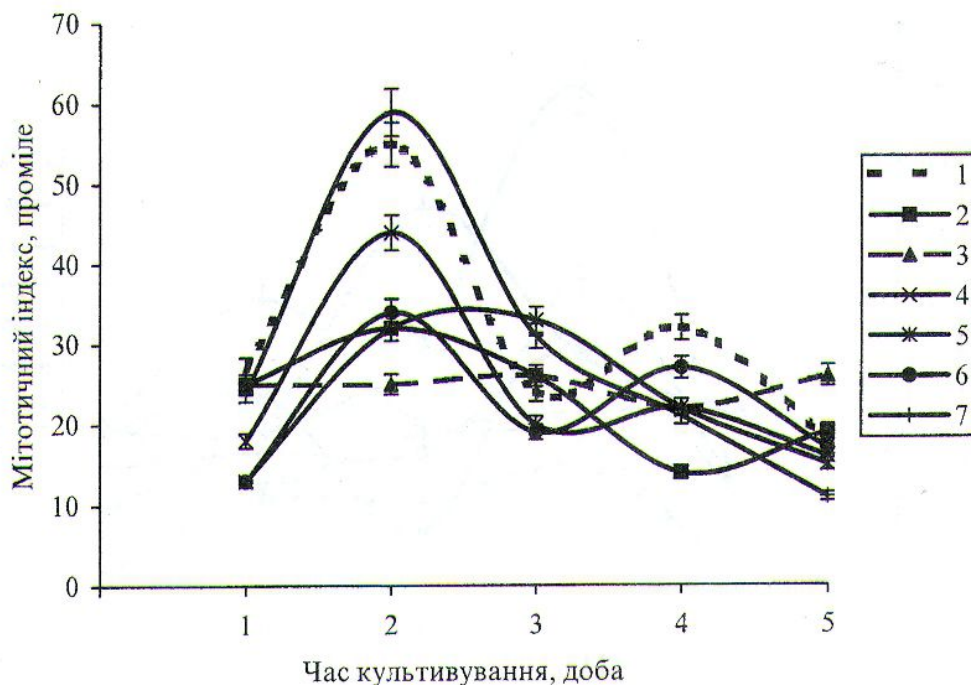


Рис. 2. Зміна мітотичного індексу культури клітин лінії L_{929} при сумісній дії $^{137}\text{Cs}^+$ та іонів важких металів: 1 - інтактний контроль; 2 - дія радіонуклідів $^{137}\text{Cs}^+$; 3 - спільна дія Ba^{2+} та $^{137}\text{Cs}^+$; 4 - Ni^{2+} та $^{137}\text{Cs}^+$; 5 - Cr^{6+} та $^{137}\text{Cs}^+$; 6 - Cu^{2+} та $^{137}\text{Cs}^+$; 7 - Pb^{2+} та $^{137}\text{Cs}^+$.

За величиною виживання клітин можна побудувати ряд: $Ni^{2+} + {}^{137}Cs^+ < Pb^{2+} + {}^{137}Cs^+ < Cu^{2+} + {}^{137}Cs^+ < Ba^{2+} + {}^{137}Cs^+ < Cr^{6+} + {}^{137}Cs^+ < {}^{137}Cs^+$. Порівнюючи ці дані з рядом, який було сформовано за середньооефективними концентраціями в попередніх дослідженнях ($Cr(2.3) < Pb(2.5) < Cu(3.8) < Ni(12.6) < Ba(349)$) [24] слід зазначити, що на тих же самих позиціях у ряду залишились свинець, мідь та барій, у той час як нікель та хром змінили своє місце в ньому. Тобто, нікель у комбінації з радіонуклідами цезію значно збільшує загибель та пригнічує проліферативну здатність L_{929} -клітин. І, навпаки, при спільній дії хрому та ${}^{137}Cs$ біологічна ефективність радіонуклідів не проявилась.

Оцінюючи мітотичну активність клітин при сумісній дії ${}^{137}Cs^+$ та іонів важких металів (див. рис. 2) можна констатувати, що для більшості вивчених випадків мітотичний індекс (МІ) нижчий, ніж в інтактному контролі, для якого характерне суттєве збільшення МІ на другу добу культивування, потім він поступово зменшується майже до початкових значень: на кривих росту цей проміжок відповідає стаціонарній фазі росту культури. Тільки для групи ${}^{137}Cs^+$ та Pb^{2+} на другу добу культивування цей показник дещо перевищує контрольні значення.

При подальшому культивуванні МІ різко зменшується і його величина менша, ніж у всіх інших групах. Стосовно ж груп Cu^{2+} та ${}^{137}Cs^+$ і Cr^{6+} та ${}^{137}Cs^+$, то вже на першу добу культивування значення МІ значно менші, ніж в інших групах. Проте від третьої до шостої діб культивування цей показник знаходиться на тому ж рівні, що і в контролі.

Динаміку утворення гігантських багатоядерних клітин, які виникають у популяції при сумісній дії важких металів та радіонуклідів ${}^{137}Cs^+$ представлено на рис. 3. Видно, що найбільша їх кількість виникає на другу добу при дії ${}^{137}Cs^+$. Високий їх рівень спостерігається також при спільній дії Ni^{2+} та ${}^{137}Cs^+$, Pb^{2+} та ${}^{137}Cs^+$, а також Cr^{6+} та ${}^{137}Cs^+$. При подальшому культивуванні рівень гігантських клітин у всіх групах зменшується, оскільки вони гинуть та елімінуються з культури.

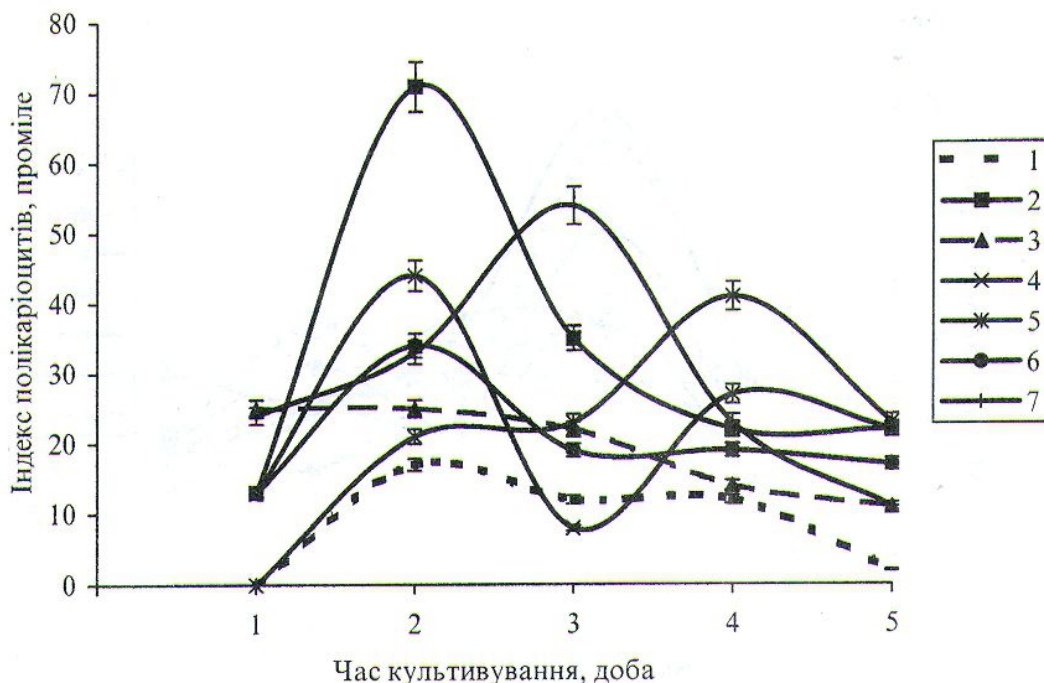


Рис. 3. Зміна кількості гігантських багатоядерних клітин в культурі L_{929} -клітин при комбінованій дії ${}^{137}Cs^+$ з важкими металами: 1 - інтактний контроль; 2 - дія радіонуклідів ${}^{137}Cs^+$; 3 - сумісна дія Ba^{2+} та ${}^{137}Cs^+$; 4 - Ni^{2+} та ${}^{137}Cs^+$; 5 - Cr^{6+} та ${}^{137}Cs^+$; 6 - Cu^{2+} та ${}^{137}Cs^+$; 7 - Pb^{2+} та ${}^{137}Cs^+$.

Таким чином, дослідження комбінованої дії $^{137}\text{Cs}^+$ та важких металів на життєздатність, проліферативну та мітотичну активність L_{929} -клітин у культурі дозволило встановити величини сорбції $^{137}\text{Cs}^+$ клітинами лінії L_{929} при сумісній дії з іонами металів. Виявлено інгібуючий вплив ізотопів $^{137}\text{Cs}^+$ та сукупної його дії з іонами металів на ріст та поділ клітин *in vitro*. При сумісній дії $^{137}\text{Cs}^+$ і Ni^{2+} , $^{137}\text{Cs}^+$ і Pb^{2+} спостерігали адитивний ефект. Встановлена послідовність вивчених агентів за величиною їх негативного впливу. Виявлено високий рівень гігантських багатоядерних клітин у популяції лінії L_{929} для груп $\text{Ni}^{2+}+^{137}\text{Cs}^+$, $\text{Pb}^{2+}+^{137}\text{Cs}^+$ та $\text{Cr}^{6+}+^{137}\text{Cs}^+$, що свідчить про їх значний вплив на репродуктивну загибель клітин.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Всебічна оцінка ризиків внаслідок аварії на ЧАЕС.* - Київ: Укр. радіологічний учбовий центр, 1998. - 95 с.
2. *Ершов Ю.А., Плетнева Т.В.* Механизмы токсического действия неорганических соединений. - М.: Медицина, 1989. - 278 с.
3. *Handbook on the Toxicology of Metals* // Eds L. Friberg, G.F. Nordberg, B.V. Vourek. - Amsterdam: Elsevier - North-Holland Biomed. Press. - 1979. - 687 p.
4. *Cadmium, nickel, some epoxides, miscellaneous industrial chemicals and general consideration on volatile anaesthetics* // Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. - Lyon: IARC. - 1976. - Vol. 11. - 306 p.
5. *Довгалюк 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.
6. *Wierzbicka M.* Mitotic disturbances induced by low doses of inorganic lead // *Caryologia*. - 1988. - Vol. 41. - P. 143 - 160.
7. *Wierzbicka M.* Disturbances in cytokinesis caused by inorganic lead // *Environ. Exp. Bot.* - 1989. - Vol. 29. - P. 123 - 133.
8. *Максимчук Т.Т., Бабенко Т.А.* Особенности генотоксического и канцерогенного действия металлов // *Экспер. онкол.* - 1990. - Т. 12, № 4. - С. 3 - 9.
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 - Vol. 43. - P. 125 - 133.
10. *Сьяксте Т.Г., Сьяксте Н.И.* Химические соединения, повреждающие ДНК. - Рига: Зинатне, 1991. - 152 с.
11. *Строчкова Л.С., Юрова А.В., Жаворонков А.А.* Влияние никеля на организм человека и животных // *Успехи современной биологии.* - 1987. - Т. 103, № 1. - С. 143 - 155.
12. *Привезенцев К.В., Сирота Н.П., Газиев А.И.* Влияние сочетанного воздействия Cd и γ -радиации на повреждение и репарацию ДНК в лимфоидных тканях мышей // *Радиационная биология. Радиоэкология.* - 1996. - Т. 36, вып. 2. - С. 234 - 239.
13. *Nichioka H.* Mutagenic activities of metal compounds in bacteria // *Mutat. Res.* - 1975. - Vol. 31. - P. 185 - 189.
14. *Kanematsu N., Hara M., Kada T.* Rec assay and mutagenicity studies on metal compounds // *Ibid.* - 1980. - Vol. 77. - P. 109 - 116.
15. *Бигалиев А.Б.* Генетический эффект солей тяжелых металлов как загрязнителей окружающей среды // *Успехи совр. генетики.* - 1982. - Вып. 10. - С. 104 - 114.
16. *Di Paolo J.A., Casto B.C.* Quantitative studies of *in vitro* morphologic of Syrian hamster cells by inorganic metal salts // *Cancer Res.* - 1979. - Vol. 39, No. 3. - P. 1008 - 1013.
17. *Чекунова М.П., Фролова А.Д.* Современные представления о биологическом действии металлов // *Гиг. и сан.* - 1986. - № 12. - С. 18 - 21.
18. *Serkiz Ya., Pinchuk V., Drushina N.* Chemiluminescence of Irradiated Animal Blood Plasma // *J. Bioluminescence and chemiluminescence.* - New York, 1990. - Vol. 5. - P. 1310 - 1313.
19. *Серкиз Я.И., Пинчук В.Г., Пинчук Л.Б. и др.* Радиобиологические аспекты аварии на Чернобыльской АЭС. - Киев: Наук. думка, 1992. - 172 с.

20. Пелевина И.И., Готлиб В.Я., Кудряшова О.В., и др. Нестабильность генома после воздействия радиации в малых дозах (в 10 - км зоне аварии на ЧАЭС и в лабораторных условиях) // Радиационная биология. Радиоэкология. - 1996. - Т. 36, вып. 4. - С. 546 - 560.
21. Зайнуллин В.Г. Мутабельность природных популяций и лабораторных линий дрозофилы в условиях хронического облучения в малых дозах низкой интенсивности // Радиационная биология. Радиоэкология. - 1996. - Т. 36, вып. 4. - С. 561 - 566.
22. Черников А.В., Фоменко Л.А., Ревина Г.И. и др. Исследование сочетанного хронического воздействия γ -радиации и свинца на образование и репарацию поврежденных ДНК у мышей // Радиационная биология. Радиоэкология. - 1998. - Т. 38, вып. 6. - С. 787 - 792.
23. Иванов С.Д., Кованько Е.Г. Развитие отдаленных эффектов радиационно-химических воздействий // III-съезд по радиационным исследованиям. Тез.докл. - 1997. - Москва, Пушкино. - Т. 2. - С. 224 - 225.
24. Башлыкова Л.А. Частота микроядер в клетках костного мозга при комбинированном воздействии гамма-излучения и солей тория // Там же. - С. 92 - 93.
25. Витвицкий В.Н., Соболева Л.С., Шевченко В.А. Модификация мутагенных эффектов гамма-излучения солями хрома (VI) и свинца (II) // Там же. - С. 222 - 223.
26. Адамс Р. Методы культуры клеток для биохимиков. - М.: Мир, 1983. - 385 с.
27. Дудченко Т.М., Лавренчук Г.Й., Набока М.В. та ін. Цитотоксичний вплив важких металів на культуру L-клітин // Цитология и генетика. - 1999. - Т.34, № 6. - С. 55 - 61.

ВЛИЯНИЕ КОМБИНИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ ^{137}Cs И ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА ПОКАЗАТЕЛИ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ L_{929} -КЛЕТОК В КУЛЬТУРЕ

Т. Н. Дудченко, Г. Й. Лавренчук, Я. И. Серкиз

Изучена зависимость изменения показателей жизнеспособности клеток линии L_{929} in vitro от комбинированного влияния разных концентраций тяжелых металлов и радионуклидов цезия. Барий, никель и хром увеличивают сорбцию $^{137}\text{Cs}^+$ клетками. Свинец и медь ингибируют этот процесс. При комбинированном действии Ni^{2+} с $^{137}\text{Cs}^+$ и Pb^{2+} с $^{137}\text{Cs}^+$ наблюдался аддитивный эффект. Показано, что при комбинированном действии Cr^{6+} с $^{137}\text{Cs}^+$ эффект сочетанного действия не проявляется.

COMBINED INFLUENCE OF ^{137}Cs γ -RAYS AND HEAVY METALS ON THE INDICES OF VITALITY OF THE L_{929} -CELLS IN THE CULTURE

T. M. Dudchenko, G. I. Lavrenchuk, Ya. I. Serkiz

The dependence of changing the viability indexes has been studied for L_{929} cell line after combined exposure to the concentrations of heavy metals and radionuclide of Cesium. It is established that Ba^{2+} , Ni^{2+} and Cu^{2+} increased accumulation of $^{137}\text{Cs}^+$ by the cells. Both Pb^{2+} and Cu^{2+} inhibit this process. The additive effect has been observed of Ni^{2+} with $^{137}\text{Cs}^+$ and Pb^{2+} with $^{137}\text{Cs}^+$. It is shown that during the combined actions of Cr^{6+} and $^{137}\text{Cs}^+$ the effect of consistency is not observed.