

Дейнека С.Е., Блиндер А.В., Тураш Н.Н., М\суриевская М.М.
 Институт экологии и токсикологии им. Л.И. Медведя, г. Киев
 Буковинский государственный медицинский университет,
 г. Черновцы

ЭКСПРЕСС-ОЦЕНКА IN VITRO СТЕПЕНИ ТОКСИЧНОСТИ РЯДА СОЛЕЙ МЕТАЛЛОВ

Среди химических веществ, загрязняющих объекты окружающей среды, металлы и их соединения образуют значительную группу токсикантов, которая во многом определяет антропогенное влияние на экологическую структуру окружающей среды и на самого человека [1]. Возрастающие масштабы производства и использования тяжелых металлов, их высокая токсичность, способность накапливаться в организме человека, вызывать вредное влияние даже в сравнительно низких концентрациях или дозах является мотивированной причиной для отнесения металлов к приоритетным загрязнителям окружающей среды [2].

Для оценки токсического действия химических веществ, в т.ч. соединений металлов, используются различные биологические объекты. В последнее время наряду с традиционными методами оценки токсичности на лабораторных животных все чаще находят применение и альтернативные методы исследования in vitro, к числу которых относятся и способы изучения токсичности на клеточных культурах. Данные методы исследования обладают высокой чувствительностью и информативностью, простотой и скоростью постановки, хорошей воспроизводимостью результатов [3,4].

Исследования на культурах клеток по сравнению с опытами на лабораторных животных обладают рядом преимуществ: практически это единственная возможность экспериментировать на клетках человека, изучать прижизненно метаболизм, определять количественные характеристики токсического эффекта непосредственно на клеточном уровне [5]. К достоинствам этих методов следует отнести и возможность их стандартизации, а также экономическую рентабельность.

Ориентировочная оценка токсичности ксенобиотиков, в т.ч. и соединений металлов на культурах клеток базируется прежде всего на их цитотоксическом действии и последствиях его проявления, поэтому гибель клетки, нарушения роста и процессов пролиферации, повреждение клеточных мембран, морфологические изменения клетки и другие показатели служат критериями качественной и количественной характеристики токсического действия изучаемых веществ [6].

Принимая во внимание указанное выше, нами с использованием метода клеточных культур проведена in vitro сравнительная экспресс-оценка степени токсичности ряда солей металлов.

Процедура экспресс-оценки степени токсичности солей металлов заключалась в следующем. Изучение их цитотоксического действия проводилось методом двухкратных серийных разведений на перевиваемой культуре клеток HeLa (карцинома шейки матки), которая была выращена в стандартных условиях при культивировании по общепринятой вирусологической методике и образовывала монослой. Среду, в которой культивировались клетки, замещали поддерживающей средой, содержащей исследуемые химические соединения в концентрациях от 4000 мкг/мл до 7,8 мкг/мл.

В качестве исследуемых солей металлов избраны оксалаты алюминия, железа (II), железа (III), кальция, калия, кобальта, магния и олова, стеараты бария, кальция и свинца, ацетат свинца, йодистый цезий, нитраты кадмия и свинца, сульфат кадмия, которые имеют широкое распространение и применение, в связи с чем могут в ряде случаев проявлять вредное воздействие на человека. Каждое разведение химического агента исследовалось в 3 параллельных сериях.

Объективную оценку токсикологического эффекта при однократном воздействии изучаемых веществ на культуру клеток проводили количественным способом с учетом характеристики роста клеток и связанных с ним явлений. При этом цитотоксическая активность соединений оценивалась микроскопически при помощи инвертированного микроскопа и на ее основании методом пробит-анализа для каждого вещества рассчитывались цитопатические концентрации (ЦПК), вызывающие 16%, 50% и 84% цитопатических изменений - соответственно ЦПЧ₁₆, ЦПК₅₀ и ЦПК₈₄. На основании полученных величин ЦПК₁₆; и ЦПК₈₄ по аналогии с зоной острого действия (DL_gVDL_{ie}) для каждой соли металла рассчитывались и величины ЗОНЫ ЦИТОПАТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ (ЩЖ₈₄/ЦПК₁₆).

Анализируя полученные in vitro результаты токсического действия изученных солей металлов по отношению к культуре клеток HeLa (табл. 1) следует обратить внимание на достаточно широкий диапазон цитопатической активности исследованных соединений металлов - величины их ЦПК₅₀ (цитопатической концентрации, вызывающей 50% цитопатических изменений) находились в пределах от 27.83±1.70 мкг/мл (сульфат кадмия) до 3546.441405.77 мкг/мл (стеарат кальция).

Полученные результаты свидетельствуют об влиянии на степень выраженности цитотоксического действия солей металлов характера их как кислотного остатка, так и металла, входящего в состав соединения, что согласуется с данными литературы о влиянии характера аниона и катиона на степень цитотоксичности солей металлов. Так, свинца ацетат имеет ЦПК₅₀ на уровне 186,29±33,30 мкг/мл, стеарат свинца - 263,48±30,18 мкг/мл, а нитрат свинца - 316,35±39,97 мкг/мл. ЦПК₅₀ сульфата кадмия, как отмечалось выше, составляет 27,8311,70 мкг/мл, а нитрата кадмия - 66,0314,75 мкг/мл.

Таблица 1 Величины цитопатических концентраций (ЦПК) и зоны цитопатического действия ряда солей металлов

Соединение	шік, *, мкг/мл	цпк50, мкг/мл	ЦПКм, мкг/мл	цитопатического ДСЙСПИД
Алюминия оксалат	47,99	184,69±30,57	321,39	6,70
Железа (II) оксалат	906,41	2693,51±326,28	4480,61	4,94
Железа (III) оксалат	63,82	152,49±19,83	241,15	3,78
Калия оксалат	118,68	175,97±11,46	233,27	1,97
Кальция оксалат	>2000	>2000	>2000	-
Кобальта оксалат	209,10	605,56±52,37	1002,03	4,79
Магния оксалат	164,68	268,47±23,21	372,27	2,26
Олова оксалат	104,34	211,51121,43	318,67	3,05
Бария стеарат	2085,7	2800,001184,43	3514,29	1,68
Кальция стеарат	1974,9	3546,441405,77	5117,97	2,59
Свинца стеарат	112,59	263,48130,18	414,37	3,68
Свинца ацетат	69,80	186,29133,30	352,77	5,05
Цезий йодистый	>2000	>2000	>2000	-
Кадмия нитрат	41,35	66,0314,75	90,71	2,19
Свинца нитрат	137,61	316,35139,97	495,10	3,60
Кадмия сульфат	19,02	27,8311,70	36,65	1,93

Еще более показательным является влияние характера металла на степень цитотоксичности соединений с одинаковым кислотным остатком. Например, в ряду оксалатов металлов ЦПК⁵⁰ оксалата железа (III) составляет 152,49119,83 мкг/мл, калия оксалата - 175,97111,46 мкг/мл, алюминия оксалата - 184,69+30,57 мкг/мл, олова оксалата - 211,51121,43 мкг/мл, магния оксалата - 268,47123,21 мкг/мл, кобальта оксалата 605.56+52.37 мкг/мл. Среди стеаратов металлов наибольшую цитотоксическую активность проявил стеарат свинца (его ЦПК⁵⁰ составила 263,48130,18 мкг/мл) и значительно меньшую стеараты бария (2800,001184,43 мкг/мл) и кальция (3546,441405,77 мкг/мл). Нитрат кадмия выявился более токсичным для культуры клеток (66,0314,75 мкг/мл) чем нитрат свинца (316,35139,97 мкг/мл), что согласуется с данными литературы о токсичности соединений кадмия и свинца для лабораторных животных.

Величины зоны цитопатического действия изученных солей металлов (табл. 1) также находились в достаточно широком диапазоне - от 1,68 (стеарат бария) до 6,70 (оксалат алюминия). Обращает на себя внимание влияние, в первую очередь, характера металла на величину зоны цитопатического действия. Так, соединения свинца имеют величины этой зоны от 3,60 (нитрат свинца) до 5,05 (ацетат свинца), соединения кадмия - от 1,93 (сульфат кадмия) до 2,19 (нитрат кадмия).

Полученные результаты позволяют сделать вывод о перспективности и практической значимости использования метода клеточных культур для проведения in vitro сравнительной экспресс-оценки степени токсичности солей металлов, особенно в определенных рядах этих соединений.

Литература

1. Кашкина Т. А. Влияние тяжелых металлов на биохимические процессы в организме // «Научные достижения биологии, химии, физики»: материалы международной научно-практической конференции. - Новосибирск: Изд. «Сибирская ассоциация консультантов», 2012. - С. 70-75.
2. Алексеев, Ю. В. Тяжелые металлы в агроландшафте. - СПб. : Изд-во ПИЯФРАН, 2008.-215 с.
3. Фрешни Р.Я. Культура животных клеток. - Бином. Лаборатория знаний, 2010.- 706 с.
4. Мелехова, О.П. Биологический контроль окружающей среды: Биоиндикация и биотестирование / О.П. Мелехова. - Academia. 2007. - 288 с.
5. Еропкин М.Ю. Культуры клеток как модельная система в биохимико-токсикологических исследованиях. Дис. ...д-ра биол. наук. - С.-Петербург, 2004. - 354 с.
6. Данилин И.А. Металлотioneины как биомаркеры при действии на организмы тяжелых металлов и ионизирующего излучения. Дис. ...д-ра биол. наук. - М., 2010. - 287 с.

я