

УДК 577.1/542:543:541.9:001:5

ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПЕКТРАЛЬНЫХ МЕТОДОВ В ИССЛЕДОВАНИЯХ МАЭ И МЭ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК *IN VITRO*

Андрусишина И. Н.

ГУ «Институт медицины труда АМН Украины», Київ
e-mail: irina_andrei@voliacable.com

В работе показаны возможности применения физико-химических методов - ПААС, ЭТААС и ИСП-АЭС в исследованиях по изучению содержания химических элементов в культуре клеток *in vitro*. Показано, что тяжелые металлы — свинец, кадмий и марганец — накапливаются в лейкоцитах и половых клетках животных. Выявлены отличия содержания эссенциальных элементов в лейкоцитах, эритроцитах и мужских гаметах в условиях различного их функционального состояния.

Ключевые слова: эритроциты, лейкоциты, спленоциты, мужские гаметы, макро- и микроэлементы, атомно-абсорбционная спектрофотометрия.

Введение

Традиционно спектральные методы используются в токсикологическом эксперименте на животных [1-3]. Однако, возможно их применение как альтернативного метода в исследованиях количественного содержания химических элементов в культуре клеток *in vitro*. Такой подход дает возможность не только количественно определить содержание химических элементов в культуре клеток, но и использовать данный метод как чувствительный тест при оценке внутриклеточных процессов, обусловленных токсическим воздействием. Кроме того, данный подход обладает рядом преимуществ, главным среди которых, является уменьшение числа экспериментальных животных, что соответствует принципу достаточности («reduction») в биоэтике.

Трудности определения микроэлементов (МЭ) и макроэлементов (МаЭ), в том числе и токсических металлов в клетках, связаны с низкой их концентрацией в клетке, небольшими размерами самих клеток (диаметр эритроцита 7,5 мкм, фибробласта 22-

30 мкм), а также различной способностью накапливать металлы [1, 4-7]. В результате оценки, некоторых общих закономерностей действия МЭ оказалось, что каждая клетка человеческого и животного организма в среднем содержит 10^5 - 10^6 ионов металлов из группы классических МЭ. Кроме того, МЭ находятся в клетках в виде различных комплексных соединений, которые обладают неодинаковой устойчивостью и биологической активностью, что обуславливает избирательное их накопление различными клетками и их органеллами. Так, например, в клетках иммунной системы по-разному накапливается цинк и марганец. Больше этих МЭ содержится в макрофагах и мононуклеарных клетках, но меньше в гранулоцитах [1, 5, 8-10]. Недостаток магния и цинка в лимфоцитах тормозит дифференцировку и пролиферацию этих клеток. Избыток катионов свинца, никеля и цинка стимулирует пролиферацию спленоцитов мыши [1, 5, 11].

Процессы транспорта МаЭ и МЭ во внеклеточном и внутриклеточном пуле лимитируются многофазовыми

полимодалными видами транспорта МаЭ и МЭ через цитоплазматические мембраны [1, 4, 5, 9]. Механизмы этого транспорта различны для разных групп МаЭ и МЭ. Так, они могут осуществляться путем действия на специфические рецепторы, локализованные на внеклеточных или во внутриклеточных компартментах; влияния на активность ряда ферментов, гормонов или белков-переносчиков (например, металлотионеины, альбумины). Вероятно и посредством процессов физико-химического действия на мембраны клеток (Se - антиоксидант; Cd, Pb - цитотоксиканты). В целом же сложная проблема взаимодействия между МЭ в клетке исследована недостаточно.

Поэтому целью нашего исследо-

вания явилось изучить возможности оценки уровней содержания МаЭ и МЭ современными спектральными методами (ПААС, ЭТААС и АЕС-ИСП) в различных клетках (эритроцитах, лейкоцитах, лимфоцитах и спленоцитах животных, мужских гаметах крыс) в условиях различного их функционального состояния.

Материалы и методы исследования

Эритроциты цельной крови экспериментальных животных и мужских гамет крыс отмывали физиологическим раствором с последующим центрифугированием [5,6]. Лейкоциты и лимфоциты получали из цельной крови животных, спленоциты селезенки животных отмывали методом диффе-

Таблица 1

Содержание некоторых МаЕ и МЕ в клетках крови человека и животных в норме (собственные результаты ПААС анализа и данные литературы)

Клетки крови	Химические элементы (в нМ/10 ⁷ кл)			Источник литературы
	Mg	K	Zn	
Эритроциты	3,3-5,9*	159-198*	36,8-39,8*	Педанов Ю.Ф., 1992 [15] Костюк П.Г. и др., 1988 [5] Коробков А.В., 1986 [7] Собственные данные
	12	260	-	
	47,7	71,6	12	
	3,0-6,1	44,14-48,99	30,7-32,19	
Лейкоциты	-	-	1,30-2,88*	Кудрин А.В. и др. 2000 [1] Собственные данные
	32-48	800-1200	2,0-3,4	
Макрофаги	-	-	2,88*	Кудрин А.В. и др. 2000 [1] Porit A
	-	100-170	-	
Лимфоциты	-	-	5,20*	Кудрин А.В. и др. 2000 [1] Koudrine A., 1998 [17] Собственные данные
	-	-	4,27*	
	25,37-35,61	407,85-413,2	5,30	

Примечание * - содержание в клетках крови человека

Таблица 2

Содержание МаЕ и МЕ в клетках крови и спленоцитах крыс, полученные методом ИСП-АЕС

Элемент	В эритроцитах, (M ± m), нМ/10 ⁷ кл	В лимфоцитах, (M ± m), нМ/10 ⁷ кл	В спленоцитах (M ± m) мкМ/10 ⁶ кл
Mg	6,07 ± 2,12	25,37 ± 5,12	53,48 ± 0,95
K	44,14 ± 38,48	410 ± 2,15	100,22 ± 0,95
Zn	12,7 ± 0,15	2,0 ± 0,06	0,99 ± 0,05
Fe	0,36 ± 0,41	0,07 ± 0,001	0,17 ± 0,05
Cu	0,015 ± 0,04	0,082 ± 0,03	0,162 ± 0,002
Mn	0,0016 ± 0,009	0,0097 ± 0,004	0,01 ± 0,004

рениального центрифугирования в градиенте плотности сахарозы или феколла [5]. Методом световой микроскопии подсчитывали количество клеток в суспензии. Затем пробу подвергали кислотной минерализации по общепринятой методике [12, 13] с последующим определением в пламенном (ПААС), электротермическом (ЭТААС) вариантах ААС метода или методом ИСП-АЭС (атомно-эмиссионная спектроскопия с индуктивно-связанной плазмой - метод многоэлементного анализа). Полученные результаты обрабатывали математически с использованием программы Statistika-6 [14].

Результаты и их обсуждение

Сравнительный анализ данных литературы и собственных результатов показал, что уровни содержания магния, калия и цинка в клетках крови крыс и человека в условиях нормы могут различаться (таблица 1). Выявленные отличия обусловлены не только физиологической ролью, которую выполняет конкретный элемент в клетке, но и инструментальным методом, который был использован при оценке содержания МаЭ и МЭ.

Были изучены возможности использования многоэлементного анализа (метод ИСП-АЭС), который позволяет проводить анализ содержания до 70 химических элементов в одном биологическом образце. Данные о содержании МаЭ и МЭ в эритроцитах, лимфоцитах и спленоцитах

крыс в норме представлены в таблице 2. Известно, что метод ИСП-АЭС обладает большей чувствительностью и селективностью по сравнению с ПААС. Нами обнаружены значительные колебания уровней содержания магния, калия и цинка в эритроцитах и лимфоцитах белых крыс.

Методом АЭС-ИСП выявлены изменения баланса МаЭ та МЭ в спленоцитах селезенки экспериментальных животных, при моделировании хронического катарального ринита у крыс путем интраназальных инсталляций в носовую полость 0,1 % раствора декстрана в продолжении 3-х месяцев (таблица 3). Обнаружены существенные колебания концентраций Mg^{2+} , Ca^{2+} и Cu^{2+} , Zn^{2+} в спленоцитах крыс опытной группы по сравнению с контролем. Исходя из известных фактов [13,15,17,18], о том что полученные результаты свидетельствуют о дисбалансе МаЭ и МЭ внутри клетки. Установлено [1,9,19], что «выход» магния из клеток и «вход» кальция отражает нарушение процессов трансмембранного транспорта электролитов. Накопление меди и цинка отражает процесс усиления оксидативного стресса в клетке.

Методом ПААС ранее нами было показано, что лейкоциты человека могут накапливать марганец [12]. Выявлены достоверные отличия между опытом и контролем (в контроле – $0,0016 \pm 0,002$ нМ/ 10^7 кл, в опыте – $0,0022 \pm 0,002$ нМ/ 10^7 кл) в случаях

Таблица 3

Содержание МаЭ и МЭ в спленоцитах крыс с экспериментально моделированным хроническим катаральным ринитом

Элемент, нМоль/ 10^7 кл	Контроль	Хронический катаральный ринит
Магний	$53,48 \pm 0,95$	$38,80 \pm 0,23^*$
Кальций	$25,60 \pm 0,47$	$38,60 \pm 0,44^*$
Железо	$0,17 \pm 0,05$	$0,12 \pm 0,022$
Медь	$0,16 \pm 0,02$	$0,27 \pm 0,04^*$
Цинк	$0,99 \pm 0,05$	$0,55 \pm 0,06^*$

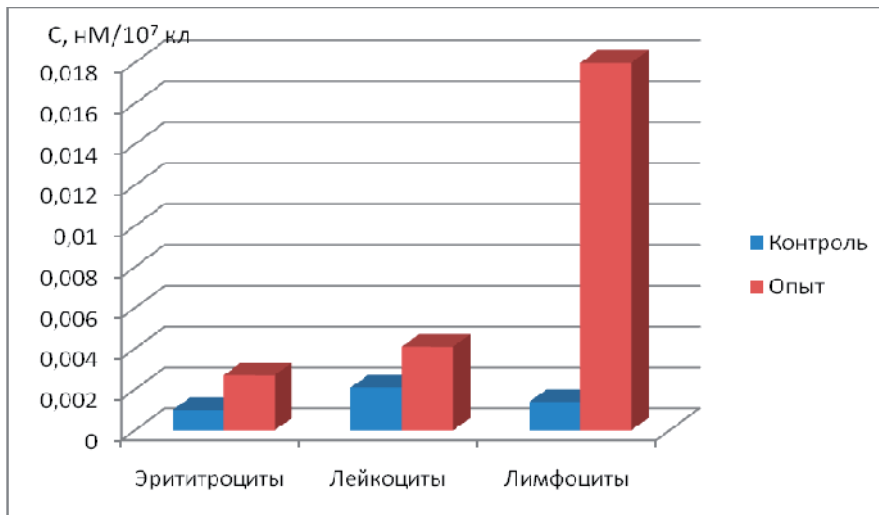


Рис. 1. Влияние 1/50 ЛД₅₀ MnCl₂ на содержание марганца в различных клетках крови белых крыс в условиях подострого эксперимента.

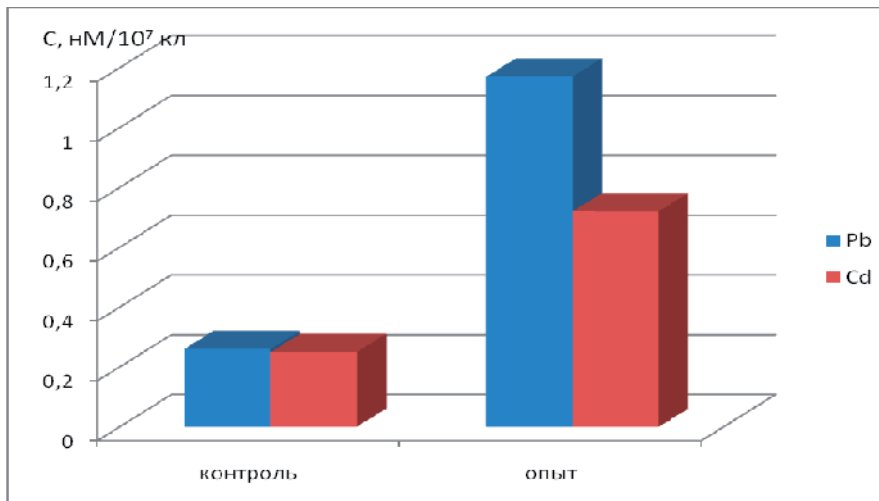


Рис. 2. Влияние 1/200 ЛД₅₀ ацетата свинца и хлорида кадмия на содержание Pb²⁺ и Cd²⁺ в различных мужских гаметах белых крыс в условиях подострого эксперимента.

быть дополнительным информативным тестом клинической диагностики Mn-интоксикации или дефицита металла в организме [4, 12, 15].

В клетках крови (эритроцитах, лейкоцитах и лимфоцитах) белых крыс линии *Wistar* в условиях моделирования марганцевой интоксикации (в/б введение дозы 1/50 ЛД₅₀ хлорида марганца в продолжение 38 дней крысам-самцам) методом ПААС было отмечено накопление металла (рис. 1), особенно выраженное в лимфоцитах крови (в контроле – 0,0014 ± 0,002 нМ/10⁷ кл, в опыте – 0,018 ± 0,002 нМ/10⁷ кл).

Известно, что тяжелые металлы избирательно накапливаются в

профессионального контакта с металлом. При этом эритроциты накапливали марганец в меньшей мере. Известно, что марганец очень быстро покидает кровеносное русло, а попав в клетку, он включается главным образом в митохондрии и лизосомы клеток [4, 9]. Невысокие уровни содержания Mn в крови часто являются препятствием для установления диагноза при Mn-интоксикации у профессиональных контингентов. Оценка накопления металла в лейкоцитах может

компартаментах клетки. Свинец обладает сродством к цитоплазматической мембране и субклеточными структурам (митохондриям и полирибосомам), что приводит к снижению аэробного энергетического метаболизма. Высокая чувствительность клеток к действию кадмия обусловлена его преимущественным накоплением в цитозоле и способностью связываться с металлотионеином. Однако в семенниках и, следовательно, мужских гаметах металлотионеина нет, что обуславливает высокую токсичность ме-

Таблица 4

Содержание электролитов в мужских гаметах крыс в условиях моделирования свинцовой и кадмиевой интоксикации, полученные методом ПААС ($M \pm m$)

Элементы нМ/10 ⁷ кл	Контроль	Рb-интоксикация	Cd-интоксикация
		48 введений	48 введений
Mg	44,4 ± 0,29	50,5 ± 0,80	75,6 ± 0,71*
K	341,9 ± 5,58	670 ± 5,08*	463 ± 4,50
Ca	17,35 ± 1,81	31,5 ± 1,73	35,6 ± 2,75

талла для репродуктивной системы крыс-самцов. Таким образом оценка содержания свинца и кадмия в мужских гаметах может быть информативным тестом при изучении тератотоксичности тяжелых металлов у экспериментальных животных [1, 9].

Методом ЭТААС определены уровни содержания свинца и кадмия в культуре мужских гамет крыс после моделирования нагрузки этими металлами (в/б введение дозы 1/200 ЛД₅₀ ацетата свинца и хлорида кадмия в продолжение 48 дней крысам-самцам) (рис. 2).

Обнаружено накопление свинца в сперматозоидах крыс, которое превышало уровень содержания в контрольной группе в 4,5 раза. Кадмий также накапливался в мужских гаметах крыс (наблюдали увеличение уровня содержания металла в 3 раза). В этом эксперименте также были выявлены изменения в содержании внутриклеточных электролитов в мужских гаметах крыс после 38 –дневной интоксикации солями свинца и кадмия. Содержание Mg²⁺, Ca²⁺ и K⁺ определяли методом ПААС (таблица 4).

Наблюдали увеличение концентрации магния (на 70 %) в сперматозоидах крыс в случае Cd-интоксикации и калия (на 35,42%) при Рb-интоксикации по сравнению с уровнями электролитов в контроле. В то же время выявлен рост уровня содержания кальция в клетках (в 1,8 и 2,05 раза соответственно), что свидетельствует о значительных изменениях морфо-

функциональной активности клеток, а именно снижению подвижности сперматозоидов, агглютинации, повреждению плазмалеммы клеток описанных нами ранее [19].

Известно, что дифференцированный характер внутриклеточного накопления МЭ в компартментах клетки имеет сложную биофизическую природу. Так, стабильное содержание меди обусловлено ее участием в процессах дыхания митохондрий. Цинк накапливается преимущественно в ядерных фракциях клеток, что обусловлено процессами синтеза и деградации металлотионеина [1, 9]. Нормальное содержание в клетке магния и калия как важнейших внутриклеточных элементов является свидетельством стабильности плазматических мембран клеток и функциональной активности самих клеток.

Выводы

1. Полученные данные о содержании химических элементов в различных клетках свидетельствует о высокой информативной значимости спектральных методов - ПААС, ЭТААС и ИСП-АЕС, что может быть использовано при оценке внутриклеточных процессов - апоптоза, нарушения метаболизма, деления клеток, изменений ионного состава, накопления токсических элементов.

2. Предлагаемый альтернативный метод исследований, может быть использован для установления четких количественных изменений

уровня МаЭ и МЭ в клетках, что позволит решать задачи по установлению металлодефицитных состояний у пациентов и совершенствовать методы их коррекции, что может стать перспективным приемом в профилактической медицине.

Литература

1. Кудрин А.В., Скальный А.В., Жаворонков А.А., Скальная М.Г., Громова О.А. Иммунофармакология микроэлементов. - М.: Из-во КМК., 2000.- 537 с.
2. Скальный А.В., Быков А.Т., Серебрянский А.П., Скальная М.Г. Медико-экологическая оценка риска гипермикроэлементозов у населения мегаполиса.-Оренбург.:РИК ГОУ ОГУ,ЮЖ, 2003.-132 с.
3. Общая токсикология /Под ред. Б.А.Курляндского, В.А.Филова.- М.:Медицина,2002.- 202 с.
4. Авцын А.П., Жаворонков А.А., Риш М.А., Строчкова Л.С. Микроэлементозы человека.- М.:Медицина, 1991.- 496 с.
5. Биофизика/Под ред.. П.Г.Костюка.-К.: Вища школа,1988.- 504 с.
6. Вейс Ч., Антони Т., Вицлеб Э. и др. Физиология человека: В 4-х томах. Т.3./Под ред. Р.Шмидта, Г.Певса.- М.:Мир,1986.- 288 с.
7. Коробков А.В., Чеснокова С.А. Атлас по нормальной физиологии/ под ред Н.А.Агаджаняна.-М.:Высшая школа, 1986.-351 с.
8. Ройт А. Основы иммунологии.-М.: Мир,1991.-328 с.
9. Трахтенберг И.М., Иванова Л.А. Тяжелые металлы и клеточные мембраны (обзор литературы)// Мед.труда и пром.токс. 1999.- №11.-С.28-31
10. Matsuda A., Kimura M., Kataoka M., et al Quantifying manganese in lymphocytes to assess manganese nutritional status//Clin.Chem.- 1989.-V.35, №9.- P.1939-1941
11. Andrusishina I. In vitro study of the effect of lead and cadmium on male gametes/18 th SSCT Annual Workshop on vitro toxicology in Sollentuna, Sweden, Sollentuna, 2000.- P.12
12. Андрусишина И.Н., Голуб И.А., Кусков Д.П. Поиск маркеров марганцевой интоксикации/ Тези доповідей II міжнародної конференції «Методи хімічного аналізу» Ужгород, 2005.- С.108-110
13. Сергієнко О.В. Роль мікроелементів у кровотворенні та оцінка мікроелементного спектра еритроцитів периферійної крові//Врачебное дело, 2006.-№6.-С.12-16
14. Антомонов М.Ю, Математическая обработка и анализ медико-биологических данных. К."Авицена", 2006.- 558 с.
15. Педанов Ю.Ф. Лабораторные показатели нормы взрослого человека. Справочник.- Одесса, 1992.- 124 с.
16. Koudrine A.V. Broncho-Vaxom effects on zink content in mononuclear cells of peritheral blood of patients with chronic non-obstructive bronchitis/Metal ions in biology and medicine.-1998.-V.5.- P.440-443
17. Wieleba E., Pasternak K., Brzozowski I., Dardinska I., Kotowska I. Changes in serum and erythrocytary magnesium concentrations in sportsmen after physical exercise//Biul.magnezol.- 2001.- V.6, № 3.-P. 396-404
18. Remez I., Maljuchenko N. Cytotoxicity of cadmium, selenium, zinc and cupper to human melanoma FM3.D cells as measured by the MTT/18th SSCT annual work on in vitro toxicology in Sollentuna,Sweden,Septem 7-10, 2000.-P.10
19. Andrusishina I., Kozlov K. Influence of lead and cadmium on exchange

of electrolytes and morphological characteristics of rat s male gametes//J.Elementol,2004.-V.9, №4.-3.534-542

Резюме

ДОСВІД ВИКОРИСТАННЯ СПЕКТРАЛЬНИХ МЕТОДІВ В ДОСЛІДЖЕННЯХ МАЕ ТА МЕ В КУЛЬТУРІ КЛІТИН *IN VITRO*

Андрусишина І.М.

В роботі показано, що методи ААС - ПААС, ЕТААС та ІСР-АЕС є чутливими при вивченні токсичного впливу важких металів – свинцю, кадмію або марганцю, що проявляється в накопиченні останніх у культурі лейкоцитів, еритроцитів, спленоцитів та статевих клітин тварин. Виявлені відмінності вмісту есенціальних елементів в культурі лімфоцитів за умов їх різного функціонального стану, що може бути використано при вивченні внутрішньоклітинних процесів. Методи ААС можуть бути альтернативними в дослідженнях процесів апоптозу, порушень метаболізму, ділення клітин, змін іонного складу та накопичення токсичних елементів у культурі клітин *in vitro*.

Ключові слова: еритроцити, лейкоцити, спленоцити, чоловічі гамети, макро-і мікроелементи, атомно-абсорбційна спектрофотометрія.

Summary

EXPERIENCE IN THE USE OF SPECTROSCOPIC METHODS TO RESEARCH MAE AND ME IN CELL CULTURE *IN VITRO*

Andrusishina I.N.

It was shown that methods of AAS as FAAS, ETAAS, ICP-AES are sensitive for studying toxic effect of heavy metals - lead, cadmium and manganese, which can be observed in their accumulation in cultures of leucocytes, erythrocytes, splenocytes and sex cells in animals. The difference in the content of such essential elements in lymphocyte culture was found, depending on their different functional state, which can be used in studying intracellular processes. AAS methods can be used as alternatives when studying processes of apoptosis, metabolism disorders, cell division, changes of the ion contents and accumulation of toxic elements in culture cells *in vitro*.

Key words: erythrocytes, leukocytes, spoenotsity, male gametes, macro- and micronutrients, atomic absorption spectrophotometry.

*Впервые поступила в редакцию 05.06.2011 г.
Рекомендована к печати на заседании
редакционной коллегии после рецензирования*