УДК 577.1:57.086.83:546.48:591.465.2

ПРОЛІФЕРАЦІЯ КУЛЬТУРИ КЛІТИН ЯЙЦЕПРОВОДІВ КОРІВ ТА ОКРЕМІ БІОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ СЕРЕДОВИЩА ЗА УМОВ ДІЇ ХЛОРИДУ НІКЕЛЮ

О. В. Штапенко, І. І. Гевкан, Ю. І. Сливчук, С. В. Федорова

Інститут біології тварин УААН

Вивчено вплив хлориду нікелю на проліферативну активність та інтенсивність використання поживних речовин середовища культурою клітин яйцепроводів корів впродовж 72 годин культивування. Хлорид нікелю викликає інгібування проліферативної активності культури клітин яйцепроводів корів, що супроводжується зниженням активності лужної фосфатази та підвищенням концентрації кальцію у середовищі, зберігаючи при цьому життєздатність та функціональну активність клітин.

Несприятлива екологічна ситуація характеризується високим рівнем забруднення довкілля шкідливими факторами різного походження. Серед хімічних речовин, що забруднюють різні об'єкти зовнішнього середовища, метали та їх сполуки утворюють групу токсикантів, яка багато в чому визначає антропогенний вплив на екологічну структуру довкілля і на стан здоров'я тварин [1]. Разом з тим, більш практичного значення набуває необхідність розробки та наукового обгрунтування методів прискореного вивчення токсичних властивостей сполук металів та пошуку засобів індивідуальної профілактики їх шкідливого впливу [2].

Кожний мікроелемент має властивий йому діапазон безпечної дози та експозиції, що забезпечує оптимальне функціонування клітинних систем, але надмірна їх концентрація в організмі призводить до патологічних змін в обмінних процесах. Солі важких металів суттєво знижують окремі ланки метаболізму, важливі фізико-хімічні параметри внутрішньоклітинних структур, і тим самим одночасно впливають практично на всі компоненти клітин, порушуючи їх взаємодію і стійкість внутрішньокітинних структур. Присутність солей важких металів у середовищі, зміна їх концентрацій викликає зміни в обмінних процесах у культурі клітин, сповільнює метаболічні процеси, блокуючи активність окремих ферментів клітин**.** Цитотоксичний вплив важкі метали мають на репродуктивні органи та статеві клітини. Тому для з'ясування дії сполук металів та пошуку засобів, які проявляють протекторну активність стосовно їх токсичного впливу автори [3,4] обгрунтовують доцільність вивчення механізмів дії важких металів на клітинному рівні з проведенням досліджень на культурі клітин маткового походження.

Матеріали і методи. Метою досліджень було вивчення впливу хлориду нікелю на інтенсивність проліферативного росту та функціональну активність культури клітин яйцепроводів та біохімічні показники середовища впродовж 72 годинного культивування.

Для вирішення поставленої мети була використана розморожена культура клітин яйцепроводів з кріобанку лабораторії з початковою концентрацією клітин 1,2 млн/см^3. Об'єм середовища для культивування складав 2 см^3. Клітини контрольної групи інкубували в основному середовищі, яким було ДМЕМ з BSA.

До середовища, в якому культивувались клітини дослідних груп, додавали хлорид нікелю в концентрації 100 і 150 мкг/см^3. Клітини інкубували впродовж 72 годин у термостаті за температури 38,5 С, 5 % CO_2 і максимальній вологості. Життєздатність та функціональну активність клітин визначали за результатами проліферації клітин яйцепроводів шляхом підрахунку їх у камері Горєва та показниками біохімічних

досліджень середовища через кожних 24 години культивування впродовж трьох діб. У середовищі визначали вміст глюкози, Са, Р та активність лужної фосфатази.

Таблиця 1

Схема досліджень з вивчення дії хлориду міді на розморожену клітинну культуру

Групи	Характеристика груп	Маніпуляції
Культура клітин епітелія яйцепроводів		
Контрольна	ОС	Пересів кожні 24 години культивування, підрахунок проліферативного росту, біохімічні дослідження кондиційного середовища
Дослідна 1	ОС+ $NiCl_2$ 100 мкг/см^3	
Дослідна 2	ОС+ $NiCl_2$ 150 мкг/см^3	

Результати та обговорення. При дослідженні впливу хлориду нікелю на проліферацію клітин яйцепроводів корів впродовж 24 годинного культивування встановлено, що додавання його до культурального середовища в дозі 100 та 150 мкг/см^3 спричинило пригнічення проліферації клітин у дослідних групах у порівнянні з контрольною.

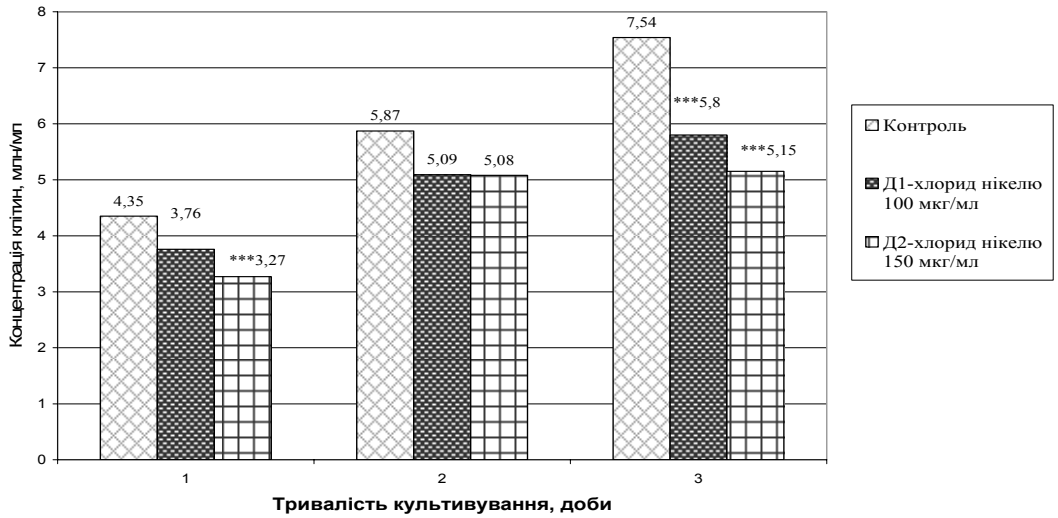

Рис. 1 Проліферативна активність культури клітин яйцепроводів за умов впливу хлориду нікелю впродовж 3 діб культивування

Концентрація клітин у дослідних групах становила 3,76±0,24 млн/см^3 та 3,27±0,05 млн/см^3 клітин проти 4,35±0,04 млн/см^3 в контрольній. Кількість клітин яйцепроводів на 48 годину культивування в обох дослідних групах була приблизно на одному рівні та дещо нижчою за контрольну. Через 72 години культивування у дослідних групах виявлено інгібування активності проліферативного росту клітин в 1,3–1,5 раз у порівнянні з контрольною групою.

Встановлено, що життєздатність та функціональна активність культури клітин яйцепроводів корів за умов дії на них хлориду нікелю знижується, але зберігається на певному стабільному рівні, що підтверджується зниженням окремих показників біохімічних досліджень (рис. 2–5) на тлі збереження інтенсивного споживання глюкози та фосфору. Так, в результаті аналізу показників біохімічних досліджень середовища виявлено (рис. 2), що вміст глюкози в середовищі впродовж 72 годин культивування в обох дослідних і контрольній групах знижується відповідно до початкової концентрації в середовищі в 1,5 раза на 24 годину культивування, що вказує на посилення обмінних процесів у культурі клітин, які потребують енергетичних затрат.

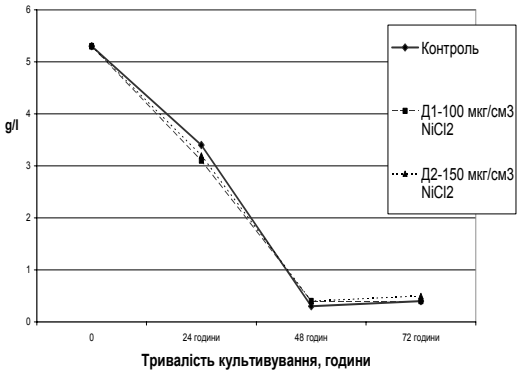

Рис. 2 Вміст глюкози у середовищі при культивуванні клітин яйцепроводів корів за умов впливу хлориду нікелю

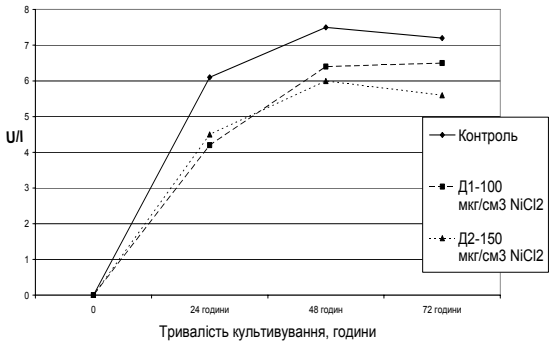

Рис. 3 Активність лужної фосфатази у середовищі при культивуванні клітин яйцепроводів корів за умов впливу хлориду нікелю

При визначенні активності лужної фосфатази в культуральному середовищі встановлено (рис. 3), що активність ферменту в дослідних групах була нижчою в порівнянні з контролем. Така активність лужної фосфатази за умов додавання до культурального середовища хлориду нікелю пов'язана з особливостями обмінних процесів, які відбуваються при адаптації клітин до введення його в культуральне середовище.

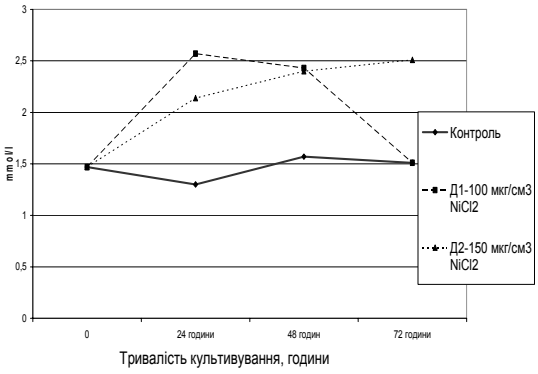

Рис. 4 Вміст кальцію у середовищі при культивуванні клітин яйцепроводів корів за умов впливу хлориду нікелю

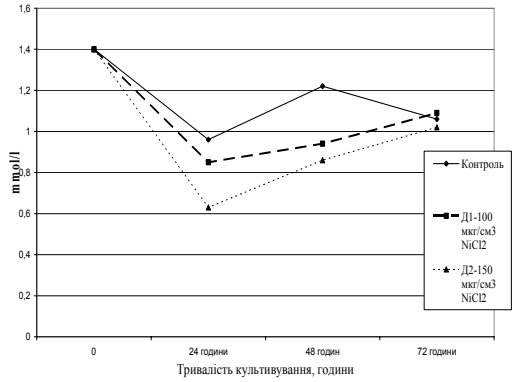

Рис. 5 Вміст фосфору у середовищі при культивуванні клітин яйцепроводів корів за умов впливу хлориду нікелю

Додавання до середовища хлориду нікелю в дозі 100 та 150 мкг/см^3 зумовило підвищення концентрації кальцію у середовищі у порівнянні з початковою концентрацією та відповідним показником у контрольній групі (рис. 4), що вказує на вивільнення мембранозв'язаного кальцію. Очевидно, іони нікелю у застосованих нами дозах, блокуючи цитоплазматичні рецептори мембран, зменшує їх проникливість [5], що призводить до виходу кальцію з клітини, зменшує транспортування речовин із культурального середовища в клітину і тим самим змінює проліферативну активність клітин.

Інтенсивність споживання фосфору клітинами під впливом хлориду нікелю на 24–48 годину культивування знижується (рис. 5), тоді як на 72 годину у 1-й дослідній групі спостерігається його підвищення, про що свідчить вищий його рівень в кондиційному середовищі в порівнянні з контролем.

В И С Н О В К И

Хлорид нікелю в дозах 100–150 мкг/мл зумовлює інгібування проліферативної активності культури клітин, зберігаючи при цьому функціональну активність клітин яйцепроводів корів, що підтверджується зниженням рівня глюкози та фосфору в середовищі, які використовуються як енергетичний субстрат, з одночасним зниженням активності лужної фосфатази та підвищення вмісту кальцію в середовищі впродовж 72 годин культивування.

Перспективи подальших досліджень. Вивчення механізмів цитотоксичного впливу окремих важких металів на культуру клітин яйцепроводів відкривають перспективи для обґрунтування та пошуку протекторних засобів щодо їх впливу на репродуктивну систему корів в техногенно-забруднених зонах та підвищення рівня запліднення.

ПРОЛИФЕРАЦИЯ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ЯЙЦЕПРОВОДОВ КОРОВ И НЕКОТОРЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СРЕДЫ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ХЛОРИДА НИКЕЛЯ

О. В. Штапенко, И. И. Гевкан, Ю. И. Слывчук, С. В. Федорова

А Н Н О Т А Ц И Я

Изучено вплияние хлорида никеля на пролиферативную активность и интенсивность использования питательных веществ среды культурой клеток яйцепроводов коров на протяжении 72 часов культивирования. Хлорид никеля вызывает незначительное ингибирование пролиферативной активности культуры клеток яйцепроводов коров, что сопровождается снижением активности щелочной фосфатазы и повышением концентрации кальция в среде, сохраняя при этом жизнедеятельность и функциональную активность клеток.

PROLIFERATION OF CATTLE OVIDUCTS CELLS AND SOME BIOCHEMICAL INDICES IN CULTURAL MEDIUM UNDER NICKEL CHLORIDE INFLUENSE

O. V. Shtapenko, I. I. Hevkan, Yu. I. Slyvchuk, S. V. Fedorova

S U M M A R Y

Nickel chloride influence on the proliferative activity and intensity of environmental nutritives usage by oviducts cells cultures of cows during 72 hours cultivation was studied. Nickel chloride decreases the cattle oviducts cells culture proliferative activity, accompanied with decrease of the activity of alkaline phosphatase and calcium concentration increase in the environment, but viability and functional activity of cells does not change.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. *Mitsuhashi J.* Development of highly nutritive culture media [Текст] J. Mitsuhashi // [Електронний ресурс] / In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. — 2001. — Vol. 37(6). — P. 330–337. — Режим доступу до журн. http://www.springerlink.com/content/

2. *Першин О. І.* Деякі ланки енергетичного обміну в лімфоцитах білих щурів при дії ацетату свинцю [Текст] / О. І. Першин, З. Д. Воробець, Г. Л. Антонюк. // Медична хімія. — 2008. — Т. 10, № 1. — С. 49–51.

3. *Forgacs Z.* Specific amino acids moderate the effects on Ni2+ on the testosterone production of mouse leydig cells in vitro [Текст] Z. Forgacs // [Електронний ресурс] Toxicol. Environmental Health J. — 2001. — Vol. 62(5). — P. 349–358. — Режим доступу до журн.

4. *Acevedo F.* Nickel-induced proteins in human HaCaT keratinocytes: annexin II and phosphoglycerate kinase [Текст] F. Acevedo // [Електронний ресурс] Toxicology. — 2001. — Vol. 159(1–2). — P. 33–41. — Режим доступу до журн.

5. *Brunella Perfetto*. Analysis of the signal transduction pathway of nickel-induced matrix metalloproteinase-2 expression in the human keratinocytes in vitro: preliminary findings [Текст] B. Perfetto, M. Lamberti, M. T. Giuliano // [Електронний ресурс] / J. of Cutaneous Pathology. — 2006. — Vol. 34(6). — P. 441–447. — Режим доступу до журн. http:// www3.interscience.wiley.com/journal

Рецензент: головний науковий співробітник НВЦ з вивчення пріонних інфекцій, доктор сільськогосподарських наук Остапів Д. Д.