

## Сравнительный анализ токсического действия алюминия на различные клеточные культуры человека

Н. Ю. Каралян

Центр профилактики особо опасных инфекций МЗ РА, прионовая лаборатория  
375025, Ереван, ул Мхитара Гераци, 12

**Ключевые слова:** хлорид алюминия, токсичность, клеточные культуры

Алюминий является нейротоксическим агентом, о чем было известно еще в XIX веке (Doelken, 1897) [по 6]. Несмотря на это токсическое действие алюминия долгое время недооценивалось, и лишь в конце XX века началось интенсивное изучение воздействия ионов алюминия на биологию нервной системы млекопитающих в целом и человека в частности. В виде микроэлемента алюминий входит в состав живых организмов, он широко используется в промышленности и медицине. Начиная с 90-х годов XX века в качестве моделей для исследования алюминиевого токсикоза широко применяются клеточные культуры как человеческого, так и животного происхождения. Именно модели *in vitro* позволяют раскрыть пока не совсем понятные механизмы нейротоксического действия алюминия [4].

Целью нашей работы было определение сравнительной токсичности хлорида алюминия на культуры клеток человека различного филогенетического происхождения. Помимо трансформированных перевиваемых клеточных линий, нами использовалась и клеточная линия эмбрионального происхождения – почки человека (НЕК). Мы учитывали не только прямое цитодеструктивное действие хлорида алюминия, но и его воздействие на основные популяционные показатели.

### Материал и методы

Базой для проведения исследований послужила лаборатория вирусологии и иммунологии НЦО МЗ РА и лаборатория цитологии Института молекулярной биологии НАН РА.

В работе использован ряд перевивных клеточных культур человека различного филогенетического происхождения:

1. SHSY5Y – перевивная линия нейробластомы человека. Клетки культивировались в среде, состоящей из смеси сред Eagle DMEM и F<sub>12</sub> в соотношении 1:1 с добавлением 10% бычьей

сыворотки. Посевная доза  $2 \times 10^5$  клеток/мл. Монослой получали через 48 часов после начала пассирования.

2. НЕК – перевивная линия эмбриональных клеток почки человека. Клетки культивировались в среде Eagle DMEM с добавлением 15% бычьей сыворотки. Посевная доза  $1 \times 10^5$  клеток/мл. Монослой получали через 48 часов после начала пассирования.
3. НЕР-2 – трансформированная перевивная линия карциномы гортани человека. Клетки культивировались в среде Eagle MEM с добавлением 10% бычьей сыворотки. Посевная доза  $1 \times 10^5$  клеток/мл. Монослой получали через 48 часов после начала пассирования.
4. RD – трансформированная перевивная линия рабдомиосаркомы человека. Клетки культивировались в среде Eagle MEM с добавлением 10% бычьей сыворотки. Посевная доза  $1 \times 10^5$  клеток/мл. Монослой получали через 48 часов после начала пассирования.

Клетки SHSY5Y и НЕК предоставлены Dr Pascale Galea (Trophos, Марсель), а НЕР-2 и RD – Институтом полиомиелита, Москва.

Действие  $AlCl_3$  на клетки перевивных культур изучали по степени деструкции монослоя и на популяционном уровне. С целью изучения токсического действия раствор  $AlCl_3$ , приготовленный *ex tempore* в соответствующей питательной среде, вносили на 48-часовой монослой изучаемой культуры и инкубировали в течение 48 часов. Наличие токсического действия  $AlCl_3$  выражали по степени деструкции клеточного монослоя. Состояние монослоя оценивалось после окраски 96-луночных планшеток с клетками кристаллиолетом.

В указанных клеточных культурах также изучалось токсическое действие  $AlCl_3$  на популяционном уровне. Для этого было определено количество клеток на единицу площади ( $0,01 \text{ мм}^2$ ), митозы (%), мертвые клетки (%). Для популяционного анализа препараты окрашивали фуксином по Фельгену после фиксации в

смеси этанола и уксусной кислоты (3:1). Определение мертвых клеток в суспензии проводилось методом трипан блау по стандартной общепринятой методике.

## Результаты и обсуждение

Известно, что токсическое действие ионов алюминия не ограничивается клетками нейронального происхождения [3, 5]. Как показали данные [2], в различных клетках возможны различные механизмы токсического действия ионов алюминия. Усредненные результаты 3-кратных опытов по воздействию различных концентраций хлорида алюминия на монослой клеточных культур представлены в табл.1.

Как следует из табл. 1, наиболее чувствительными к действию  $AlCl_3$  оказались клетки SHSY5Y и RD. По данным литературы, известно, что клетки SHSY5Y весьма чувствительны к действию практически всех ионов алюминия, причем имеются данные и о том, что

эффект ионов алюминия зависит как от концентрации, так и от времени экспозиции [2]. Однако в доступной нам литературе не найдено данных о влиянии  $AlCl_3$  на оказавшиеся весьма чувствительными к нему клетки культуры RD. Наиболее устойчивыми к воздействию  $AlCl_3$  оказались клетки эпителиального происхождения -HEp-2. Клетки HEK менее чувствительны по сравнению с SHSY5Y и RD.

С учетом данных табл.1, для популяционного анализа применялось максимальное разведение, не вызывающее цитодеструктивного действия на изучаемые клетки - 1/100 разведение исходного раствора  $AlCl_3$ . Изучение популяционных показателей, особенности пролиферативной активности клеток представляет особый интерес в связи с данными [1] об ингибирующем воздействии ионов алюминия на пролиферацию клеток. Полученные данные по изменению популяционных показателей клеток изучаемых культур под влиянием хлорида алюминия пред

Таблица 1

### Определение токсичности на монослоях культивируемых клеток

Разведения исходного раствора (10%) $AlCl_3$	48-часовое действие $AlCl_3$ на 48-часовой монослой клеток			
	SHSY5Y	HEK	HEp-2	RD
1:2	++++	++++	++++	++++
1:4	++++	++++	++++	++++
1:8	++++	+++	+++	++++
1:16	++	+	±	+++
1:32	±	-	-	+
1:64	-	-	-	±
1:128	-	-	-	-
1:256	-	-	-	-
1:512*	-	-	-	-
1:1024*	-	-	-	-

В указанных разведениях не наблюдалось морфологических изменений ни одной из изученных клеточных линий: - отсутствие деструкции, ± - разрежение клеточного пласта, + - деструкция 25% монослоя, ++ - 50% монослоя, +++ -75% монослоя, ++++ -100% разрушение клеток монослоя

Таблица 2

### Сравнительное действие хлорида алюминия на основные популяционные показатели клеточных культур

Культуры клеток	Исследуемые группы	Количество клеток на 0,01мм <sup>2</sup>	Митотический индекс (%)	Мертвые клетки (%)
HEp-2	контроль 96ч	34,7±0,9	0,9±0,2	25,0±1,9
	48ч + 48ч $AlCl_3$	34,8±1,1	1,2±0,2*	25,6±2,1
SHSY5Y	контроль 96ч	33,9±1,1	1,1±0,09	5,5±1,1
	48ч + 48ч $AlCl_3$	37,7±1,2†	0,3±0,09**	16,4±1,4†
HEK	контроль 96ч	26,5±0,8	1,5±0,17	16,7±1,2
	48ч + 48ч $AlCl_3$	24,6±0,7	1,0±0,19***	14,6±1,9
RD	контроль 96ч	34,9±1,4	0,9±0,1	16,5±1,3
	48ч + 48ч $AlCl_3$	33,6±1,5	0,1±0,01****	45,6±3,7†††

\*разница по сравнению с контролем недостоверна

\*\* достоверно ниже по сравнению с контролем (t=6.28, p<0.001)

\*\*\* достоверно ниже по сравнению с контролем (t=1.96, p<0.05)

\*\*\*\* достоверно ниже по сравнению с контролем (t=7.96, p<0.001)

† достоверно выше по сравнению с контролем (t=2.33, p<0.05)

††достоверно выше по сравнению с контролем (t=6.13, p<0.001)

††† достоверно выше по сравнению с контролем (t=7.41, p<0.001)

ставлены в табл. 2.

Как следует из табл.2, действие изучаемой дозы  $AlCl_3$  на популяционные показатели исследуемых клеточных культур не одинаково. В клетках RD, HEK, SHSY5Y  $AlCl_3$  достоверно вызывает снижение пролиферативной активности. Максимальное снижение (в несколько раз) митотического показателя отмечено в клетках RD и SHSY5Y, а в культуре HEK он снижается лишь на 50%. В клетках же HEp-2 достоверная реакция на токсическое действие алюминия отсутствует.

Параллельным с пролиферативным действием ока-

залось воздействие ионов алюминия на уровень мертвых клеток. Их процент оказался достоверно выше в культурах RD и SHSY5Y, по сравнению с интактной популяцией. В культурах HEK и HEp-2 этот показатель оказался неотличимым от фоновых значений.

Таким образом, наиболее чувствительными к действию  $AlCl_3$  оказались клетки SHSY5Y и RD. Культура HEp-2 является нечувствительной к указанной дозе хлорида алюминия, а культура HEK занимает промежуточное положение.

Поступила 25.11.05

## Մարդու փարբեր բջջային կուլտուրաների վրա ալյումինիումի տոքսիկ ազդեցության համեմատական վերլուծությունը

Ն.Յու. Կարալյան

Ալյումինիումի քլորիդի բջջաբայթայիչ ազդեցության ուսումնասիրման ժամանակ առավել զգայուն էին SHSY5Y և RD բջջային զծերը: RD, HEK, SHSY5Y կուլտուրաների պոպուլյացիոն ցուցանիշների վրա  $AlCl_3$  ազդեցության ուսումնասիրման ժամանակ պարզվել է, որ  $AlCl_3$ -ը հավաստիորեն առաջ է բերում պոլիֆերատիվ ակտիվության նվազում: HEp-2 բջջայինը ալյումինիումի տոքսիկ ազդեցության հանդեպ հավաստի ռեակցիան բացակայում է:

Մտած բջջային տոկոսը բարձր էր SHSY5Y և RD բջջայինը՝ ինտակտ բջջային պոպուլյացիայի հետ համեմատած: HEK, և HEp-2 կուլտուրաներում այս ցուցանիշը չէր տարբերվում հսկիչ խմբի տվյալներից:

Այսպիսով,  $AlCl_3$ -ի նկատմամբ առավել զգայուն էին SHSY5Y և RD բջջայինը: HEp-2 կուլտուրան հավասար դրգայի համդեպ զգայուն չէր, իսկ HEK բջջայինը իրենց զգայնությանը զբաղեցնում են միջանկյալ դիրք:

## The comparative analysis of the aluminium toxic action on different human cell lines

N. Yu. Karalyan

The obtained data demonstrate that the monolayers of SHSY5Y and RD are most sensitive to the  $AlCl_3$  cyto-destructive actions. The investigation of  $AlCl_3$  influence on population parameters of RD, HEK, SHSY5Y cultures has shown a significant decrease in proliferative activity. In HEp-2 cells, the characteristic reaction to the toxic action of aluminium was absent. The percentage of dead cells was significantly increased in RD and SHSY5Y

cells, in comparison with the intact population. In cultures HEK and HEp-2 this parameter was similar to the control.

Thus, the most sensitive to the action of  $AlCl_3$  are SHSY5Y and RD cells. HEp-2 culture is stable to the specified doze of chloride of aluminium, and HEK culture has an intermediate position.

## Լիտերատուրա

1. Anisimov A.G., Bolotnikov I.A. Treatment of synchronized K562 cells by tetrafluoroaluminate does not modulate the fluorescence of ethidium bromide and 4'-diamidine-2-phenylindole in case of the binding with nucleoid DNA, *Tsitologiya*, 1999;41(8):680-4
2. Campbell A., Hamai D., Bondy S.C. Differential toxicity of aluminum salts in human cell lines of neural origin: implications for neurodegeneration, *Neurotoxicology*, 2001, 22(1):63-71.
3. Dominguez M.C., Sole E., Goni C., Ballabriga A. Effect of aluminum and lead salts on lipid peroxidation and cell

survival in human skin fibroblasts, *Biol. Trace Elem. Res.*, 1995, 47(1-3):57-67

4. Nayak P., Chatterjee A. K. Response of regional brain glutamate transaminases of rat to aluminum in protein malnutrition, *BMC Neurosci.*, 2002, 28;3(1):12
5. Sargazi M., Roberts M. M., Shenkin A. In vitro studies of aluminium-induced toxicity on kidney proximal tubular cells, *J. Inorg. Biochem.*, 2001, 87 (1-2), p. 37-43
6. Zatta P., Lain E., Cagnolini C. Effects of aluminum on activity of Krebs cycle enzymes and glutamate dehydrogenase in rat brain homogenate, *Eur. J. Biochem.*, 2000, 267, p. 3049-3055.