

Изменения цитометрических показателей ядра и ядрышек при алюминиевом токсикозе в клеточных культурах человека

Н. Ю. Каралян, Л. Н. Мкртчян, М. Г. Манрикан, Л. О. Аброян

*Центр профилактики особо опасных инфекций МЗ РА, прионовая лаборатория
Институт молекулярной биологии, лаборатория физико-химической биологии клетки
375029, Ереван, ул. Асратяна, 7*

Ключевые слова: ядро, ядрышко, хлорид алюминия

Алюминий является не только важным клеточным токсином, но и одним из наиболее значительных этиологических факторов нейродегенеративных заболеваний, включая болезнь Альцгеймера [13]. Несмотря на весьма широкое распространение в природе и медико-биологическое значение, механизм алюминиевого патогенеза остается не до конца раскрытым. Цитопатогенез алюминия является одной из наиболее важных и наименее изученных проблем современной токсикологии [15]. В основной массе работ, изучающих тему клеточных патологий, вызываемых ионами алюминия, указывается на вакуолизацию цитоплазмы, некоторые изменения структуры клетки. В середине 80-х годов XX века была показана вовлеченность ядерных структур в алюминиевый патогенез [11, 12]. Почти одновременно с этим, в работе Wen & Wisniewski [14], указывалось на связь алюминия с рибосомальной РНК (рРНК) при нейродегенеративных процессах в условиях *in vivo*. Как известно, синтез рРНК происходит в ядрышках. В связи с вышеуказанным нами была поставлена цель — изучить цитометрические аспекты алюминиевого токсикоза в ядерных структурах клеток культур человека различного происхождения.

Материал и методы

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 F₁₂ в соотношении 1:1 с добавлением 10% бычьей сыворотки. Посевная доза 2 × 10⁵ клеток/мл. Монослой получали через 48 часов после начала пассирования.

2. HEK — перевивная линия эмбриональных клеток почки человека. Клетки культивировались в среде Eagle DMEM с добавлением 15% бычьей сыворотки. Посевная доза 1 × 10⁵ клеток/мл. Монослой получали через 48 часов после начала пассирования.

3. HEp-2 — трансформированная перевивная линия карциномы гортани человека. Клетки культивировались в среде Eagle MEM с добавлением 10% бычьей сыворотки. Посевная доза 1 × 10⁵ 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 × 10⁵ клеток/мл. Монослой получали через 48 часов после начала пассирования.

Клетки SHSY5Y и HEK предоставлены Dr Pascale Galea (Trophos-Марсель), а HEp-2 и RD — Институтом полиомиелита, Москва.

Для цитометрических и цитологических исследований весь материал фиксировали в 96° этиловом спирте в течение 30 мин, а затем одновременно окрашивали основным фуксином по Фельгену. Гидролиз ДНК проводили в 5N HCl в течение 1 часа при t = 22°C (в термостате) и красили реактивом Шиффа по Стоуэлу [3].

Количественное определение площади и периметра каждого из ядрышек в отдельности (для определения тотального ядрышка в многоядрышковых клетках суммировали полученные значения) производили на сканирующем микроскопе-фотометре, оснащенный компьютером и видеокамерой телевизионным методом на максимуме поглощения комплекса ДНК-фуксин (длина волны 575 нм). Измерения, выраженные в условных единицах, в каждом случае производили в 100 ядрах.

Токсическое действие $AlCl_3$ на исследуемые клетки перевивных культур изучали по степени деструкции монослоя и на популяционном уровне [1].

Для исследований применялось максимальное разведение хлорида алюминия, не вызывающее цитодеструктивного действия, при 48-часовой экспозиции, в изучаемых клетках – 1% $AlCl_3$ [1].

Результаты и обсуждение

Как известно, токсическое действие ионов алюминия не ограничивается клетками нейронального происхождения [6] и в различных клетках возможны различные механизмы токсического действия ионов алюминия [7]. Для оценки динамики изменений ядерных цитометрических показателей изучалось 48-часовое воздействие хлорида алюминия на все клеточные линии. Основные изученные цитометрические параметры приведены в табл. 1.

Таблица 1
Изменение ядерных показателей под действием алюминиевого токсикоза

Культуры клеток	Исследуемые группы	Площадь ядра (у.е.)	Периметр ядра (у.е.)
HEp-2	контроль 96ч	56,2±1,4	17,4±0,3
	48ч +48ч $AlCl_3$	45,1±1,3*	15,5±0,3*
SHSY5Y	контроль 96ч	40,8±1,0	15,9±0,4
	48ч +48ч $AlCl_3$	36,7±1,0**	14,0±0,3*
HEK 293	контроль 96ч	68,4±1,9	28,3±0,5
	48ч +48ч $AlCl_3$	62,1±2,2**	17,7±0,5*
RD	контроль 96ч	47,3±1,5	15,3±0,3
	48ч +48ч $AlCl_3$	44,2±1,8	14,9±0,4

* достоверно по сравнению с контролем, $p < 0,001$

** достоверно по сравнению с контролем, $p < 0,05$

Как следует из табл. 1, площадь и периметр ядер достоверно снижаются во всех клеточных линиях, за исключением RD.

Нами были изучены изменения количества ядрышек и их абсолютных размеров во всех исследуемых группах. Данные по этим показателям приведены в табл. 2.

Как следует из табл. 1, в клеточных культурах SHSY5Y, HEK 293 хлорид алюминия вызывал достоверное уменьшение площади ядрышек, в культуре RD под его воздействием показана тенденция к уменьшению этого показателя. Также в клетках HEK 293 показано достоверное снижение среднего числа ядрышек на ядро.

Таким образом, нами продемонстрировано угнетение ядрышкового аппарата под воздействием хлорида алюминия.

В табл. 2 приведены данные по динамике основных ядрышковых показателей при воздействии ионов алюминия.

Таблица 2
Изменение основных ядрышковых показателей под действием алюминиевого токсикоза

Культуры клеток	Исследуемые группы	Среднее количество ядрышек на ядро	Суммарная площадь ядрышек (у.е.)	Суммарный периметр ядрышек (у.е.)
HEp-2	контроль 96ч	1,9±0,2	5,0±0,2	5,7±0,3
	48ч +48ч $AlCl_3$	1,8±0,2	5,4±0,2	6,1±0,3
SHSY5Y	контроль 96ч	1,9±0,3	3,7±0,2	4,6±0,2
	48ч +48ч $AlCl_3$	1,5±0,1	2,3±0,1*	3,0±0,2*
HEK 293	контроль 96ч	2,1±0,2	5,6±0,3	6,4±0,3
	48ч +48ч $AlCl_3$	1,5±0,2***	4,3±0,2**	4,8±0,3**
RD	контроль 96ч	1,9±0,1	6,5±0,7	6,1±0,4
	48ч +48ч $AlCl_3$	1,8±0,1	5,3±0,4****	5,3±0,4

* достоверно по сравнению с контролем, $p < 0,001$

** достоверно по сравнению с контролем, $p < 0,01$

*** достоверно по сравнению с контролем, $p < 0,05$

**** тенденция

Как видно из табл. 2, ядрышковый аппарат существенно угнетается под воздействием хлорида алюминия во всех культурах, кроме HEp-2.

С учетом некоторой противоречивости данных по ядру и ядрышкам, а также принимая во внимание

мание данные литературы, было решено вычислить относительные соотношения изученных показателей.

Данные по ядрышково-ядерным соотношениям и их изменению при воздействии ионов алюминия приведены на рисунке.

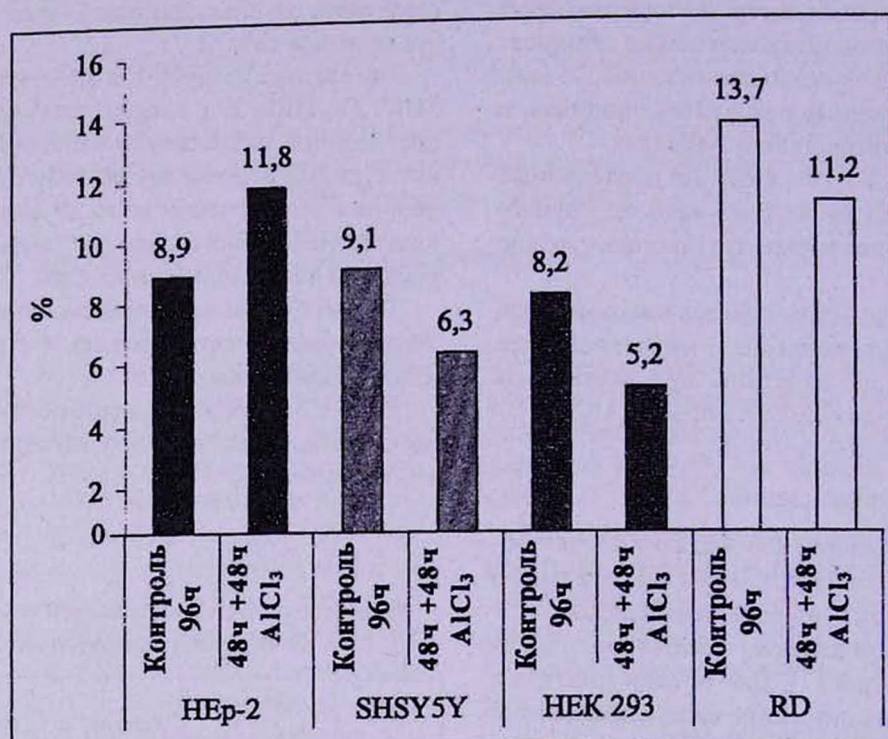


Рисунок. Доля площади ядрышка в площади ядра

Как следует из рисунка, за исключением культуры HEp-2, реакция клеток является сходной — происходит снижение доли ядрышкового компонента в общей площади ядра. Эти исследования в целом совпадают с нашими более ранними данными [1] об устойчивости клеток линии HEp-2 к токсическому воздействию ионов алюминия и говорят о том, что ядрышковые цитометрические показатели при алюминиевом токсикозе более адекватно характеризуют степень патологического состояния клеточной популяции.

Полученные результаты свидетельствуют об уменьшении площади ядер и ядрышек в клеточных культурах. Так как площадь ядрышек напрямую свидетельствует о функциональном состоянии клетки в целом и трансляционной активности в частности [5, 10], можно сделать вывод о токсическом

воздействии хлорида алюминия на клеточные линии. Однако нами впервые показано, что угнетение площади ядрышка, в чувствительных к воздействию ионов алюминия клетках, наблюдается как в абсолютных, так и относительных показателях по отношению к площади ядра. Следовательно, ядрышковые показатели при алюминиевом токсикозе являются более достоверным показателем цитотоксического действия, нежели ядерные индексы. Возможное объяснение этого явления — селективный отбор токсическим фактором более устойчивых клеток с низкой трансляционной активностью. Но этот механизм не может быть основным механизмом описанных выше эффектов. Так, согласно данным [2], в клеточных культурах, как и в условиях *in vivo*, число ядрышек в ядре генетически детерминировано, и, следова-

тельно, при селективном отборе следует скорее ожидать изменения среднего числа ядрышек на ядро, что не наблюдается в полученных результатах.

Объясняется этот феномен скорее всего изменениями клеточного цикла. Известно, что объемы ядрышек в G_2 фазе оказываются примерно в 2 раза больше, чем в G_1 фазе [9], и, поскольку ранее нами показано значительное снижение пролиферативной активности клеток и подавление митотического индекса в различных популяциях под действием хлорида алюминия [1], блокирование клеток в фазе G_1 приведет к угнетению цитометрических показателей ядрышек. С учетом данных [4, 8] о взаимосвязи между площадью ядрышкообразующих регионов и скоростью клеточного цикла, а также

данных о подавлении митотического индекса в чувствительных клеточных культурах под воздействием ионов алюминия можно сделать вывод об ингибирующем влиянии ионов алюминия на основные метаболические процессы в клетке в целом.

В то же время молекулярные механизмы подобного действия алюминия не совсем понятны. Согласно данным Quintana et al. [11], в ядрышках значительного числа типов клеток содержится определенное количество алюминия без развития какой-либо патологии. В работе Wen & Wisniewski [14], проведенной в условиях *in vivo*, было сделано предположение, что причиной нейротоксического воздействия алюминия может являться связь ионов алюминия с рРНК.

Поступила 23.02.07

Կորիզի և կորիզակների ցիտոմետրիկ ցուցանիշների փոփոխությունները ալյումինիումային տոքսիկոզի ժամանակ մարդու բջջային կուլտուրաներում

Ն.Յու. Կարալյան, Լ.Ն. Մկրտչյան, Մ.Հ. Մանրիկյան, Լ.Օ. Աբրոյան

Մարդու 4 բջջային գծերի ուսումնասիրման ժամանակ ցույց է տրվել, որ զգայուն բջջաներում ալյումինիումի բյուրեղի ազդեցության ներքո նվազում են կորիզակների ցիտոմետրիկ ցուցանիշները: Կորիզային և կորիզակային ինդեքսների համադրումը պարզել է, որ կորիզակային

ցիտոմետրիկ ցուցանիշները ալյումինիումային տոքսիկոզի ժամանակ առավել համարժեք են բնութագրում բջջային պոպուլյացիայի ախտաբանական վիճակի մակարդակը: Աշխատանքում քննարկվում են ալյումինիումի մման ազդեցության հնարավոր մեխանիզմները:

Changes in nuclear and nucleolar cytometric indices under the action of aluminium toxicosis in human cellular cultures

N. Yu. Karalyan, L. N. Mkrtchyan, M. H. Manrikyan, L. O. Abroyan

The study of 4 human cellular lines showed that in sensitive cells under the influence of aluminium chloride there occurs an inhibition of a nucleolar cytometric indices. Comparison of nuclear and nucleolar indices revealed that nucleolar cytometric indices at aluminium

toxicosis characterize the degree of the pathological condition in a cellular population more adequately. The possible mechanisms of the aluminium ions action are discussed.

Литература

1. Караян Н. Ю. Сравнительный анализ токсического действия алюминия на культуры клеток человека. Мед. наука Армении НАН РА, 2006, т. XLVI, 1, с.111-113.
2. Кучерявая Н. А., Завольная Е. С., Вахтин Ю. Б. Изменчивость числа ядрышек в потомствах интактных и УФ-облученных клонированных клеток HeLa и наследуемость этого признака. Цитология и генетика, 1981, т.15, 5, с.3-7.
3. Магалян Ю. А., Каралова Е. М. Цитофотометрия ДНК. Ереван, 1989.
4. Canet V., Montmasson M.P., Usson Y., Giroud F., Brugal G. Correlation between silver-stained nucleolar organizer region area and cell cycle time, Cytometry, 2001 Feb 1;43(2):110-6.
5. Derenzini M., Trete D., Pession A., Govoni M., Sirri V., Chieco P. Nucleolar size indicates rapidity of cell proliferation in cancer tissues, J. Pathol., 2000 Jun; 191 (2) 181-6.
6. 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 Jan-Mar;47(1-3):57-67.
7. Exley C., Birchall J.D. The cellular toxicity of aluminium, J., Theor. Biol., 1992 Nov 7;159(1):83-98.
8. Horky M., Kotala V., Anton M., Westerska-Gadek J. Nucleolus and apoptosis, Ann. N. Y. Acad. Sci., 2002, Nov; 973:258-64.
9. Lepoint A., Goessens G. Quantitative analysis of Erlich tumor cell nucleoli during interphase, Exp. Cell. Res., 1982, 121, p.120-128.
10. Plate K.H., Ruschhoff J., Mennel H.D. Nucleolar organizer regions in meningiomas. Correlation with histopathologic malignancy grading, DNA cytometry and clinical outcome, Anal. Quant. Cytol. Histol., 1990, Dec;12(6):429-38.
11. Quintana C., Olmedilla A., Antoine N., Ollacarizqueta A. The occurrence of metals Al, Fe, Ni, Cu, Zn in the nuclei of animal cells: an ultrastructural, in situ, X-ray microanalytical study, Biol. Cell, 1987;61(3):115-9.
12. Truchet M., Jeantet A. Y, Petter C. Cell nucleus intervention in aluminium concentration by the rat liver cells. Experimental study, C R Acad Sci III, 1987;305(7):259-63.
13. Walton J. R. Aluminum in hippocampal neurons from humans with Alzheimer's disease, Neurotoxicology, 2006, May;27(3):385-94.
14. Wen G. Y., Wisniewski H. M. Histochemical localization of aluminum in the rabbit CNS, Acta Neuropathol. (Berl), 1985;68(3):175-84.
15. Zatta P., Lain E. and 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.