

This fact gives us reason to argue that genetic engineering does not lead to negative consequences on the cell ultrastructure. Also that the development of pathological reactions caused by virus in transgenic plants and wild-type plants was similar. Consequently, based on these parameters transgenic plants are not altered from wild-type plants and can be used in agriculture.

*Key words: interferon, transgenic plants, phytovirus*

Рекомендує до друку

Надійшла 23.02.2018

Н. М. Дробик

УДК 57.086.83:661.874:504.5

О. В. ШТАПЕНКО, Ю. І. СЛИВЧУК, І. І. ГЕВКАН

Інститут біології тварин НААН, Львів  
вул. В. Стуса, 38, Львів, 79034

## **ВПЛИВ ХЛОРИДУ НІКЕЛЮ НА МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ТА МЕТАБОЛІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ КЛІТИН *IN VITRO***

Досліджено залежність росту та метаболічних змін у клітинах яйцепроводів корів за різної концентрації хлориду нікелю. Показано, що обидві концентрації хлориду нікелю 100 та 150 мкг/мл спричиняють зниження проліферативного росту клітин яйцепроводів впродовж 72 годин культивування, однак більш виражений вплив виявлено за вищої дози сполуки.

Зниження інтенсивності проліферації клітин, зумовлене хлоридом нікелю, супроводжувалася змінами метаболічних процесів у культурі клітин. Виявлено, що вища концентрація вірогідно знижує виживання клітин, їх здатність до поділу ( $P < 0.001$ ), знижує інтенсивність споживання фосфору ( $P < 0.001$ ) та вірогідно підвищує вміст кальцію ( $P < 0.01$ ).

*Ключові слова: культура клітин in vitro, нікель хлорид, проліферація, цитотоксичність*

Значне забруднення довкілля важкими металами як продуктів техногенної діяльності, викликає у тварин зниження функціональної активності репродуктивної системи і, зокрема, її активних клітинних елементів, таких як ростучі фолікули, епітелій яйцепроводів та маткових залоз, які відіграють провідну роль в оогенезі, ембріогенезі та живленні ембріонів [2, 3].

Дослідження впливу сполук важких металів в умовах *in vitro* дозволяє реєструвати навіть незначні зміни на клітинному рівні, які проявляються у вигляді різних патологічних порушень на рівні організму, оскільки вивчення органоспецифічної дії сполук в умовах *in vivo* ускладнене структурною та функціональною гетерогенністю клітин організму. Найбільш важливим в цьому аспекті є визначення цитостатичного та цитотоксичного (генотоксичності) ефекту, оскільки відомо, що ушкодження ДНК можуть ініціювати злоякісне переродження клітин, а в разі змін ДНК у статевих клітинах виникає небезпека для здоров'я нащадків [2].

Нікель належить до групи ультрамікроелементів. Він є кофактором низки ферментів, зокрема, 5-нуклеозидфосфатази, аргінази, уреаз, ацетил-КоА-декарбоксилази, Ni/Fe-гідрогенази, ензимів шлунко-кишкового тракту [5, 8, 14]. У період ембріонального розвитку нікель концентрується у тканинах та органах, які пов'язані з кровотворною функцією, задіяні в біосинтезі гормонів, вітамінів, біологічно активних речовин. Так, у період ембріогенезу нікель виявляється в печінці і селезінці плода людини на 20-25 тижні [4]. Абсорбція нікелю при вагітності та лактації збільшується.

Біологічна роль нікелю пов'язана з його участю в структурній організації та функціонуванні основних клітинних компонентів – ДНК, РНК та білку. Відомо, що іони  $Ni^{2+}$

стабілізують структуру нуклеїнових кислот та рибосом [12, 15], однак їх надлишок змінює протікання процесу біосинтезу білка внаслідок гідролізу тРНК.

Поряд із цим, доведено, що іони нікелю є досить агресивним мутагенним, канцерогенним і токсичним фактором. Згідно класифікації Міжнародного агентства з дослідження раку (IARC) деякі сполуки нікелю (металічна пилюка нікелю та гіпосульфат нікелю) визнані канцерогенними та включені до офіційного реєстру канцерогенних речовин ВООЗ як один з найбільш небезпечних забруднювачів навколишнього середовища [6]. Відомо, що генотоксичний ефект іонів важких металів реалізується як через механізми порушення структури ДНК за безпосереднього впливу на процеси транскрипції, трансляції та реплікації [9], так і через пригнічення системи антиоксидантного захисту [20]. Іони нікелю здатні викликати одно- та дволанцюгові розриви, модифікацію основ (наприклад формування 8-гідроксидезоксигуанозинових похідних), формування поперечних зшивок ДНК. Такі uszkodження запускають механізми зупинки клітинного циклу та репарацію ДНК, а у разі критичних uszkodжень, активуються процеси апоптозу чи виникає потенціальна загроза ініціації канцерогенезу [16].

Токсична дія іонів нікелю зумовлена ослабленням антиоксидантного захисту клітини через зв'язування іонами металів сульфгідрильних груп глутатіону та ліпоевої кислоти [6]. Це призводить до індукції оксидативного стресу, підвищення вмісту активних форм кисню, що викликає uszkodження ДНК і також дестабілізує реалізацію генетичного матеріалу.

У ряді досліджень було виявлено, що негативний вплив важких металів, зокрема, нікелю може бути пов'язаний з індукцією епігенетичних модифікацій через метилювання цитозинових основ ДНК [1]. Особливо важливим є період раннього ембріогенезу, оскільки саме в цей період відбувається фіксація основних епігенетичних маркерів [17], які здатні призводити до виражених фенотипічних наслідків.

Отже, дослідження впливу різних концентрацій важких металів у клітинних культурах репродуктивних органів дозволить з'ясувати механізми реалізації репродуктивної функції при інтоксикації тварин у зонах забруднених важкими металами. Проведення досліджень на культурі клітин *in vitro* дозволяє проводити експрес-оцінку токсичності та оптимальної дози речовин, дослідження порушень обміну речовин у клітині, вивчення цито- та органотоксичності.

### Матеріал і методи досліджень

Експериментальні дослідження виконані на первинній культурі клітин яйцепроводів корів, яку отримували в асептичних умовах у лабораторії Інституту біології тварин НААН механічним подрібненням тканини, відмиванням від крові розчином Хенкса з додаванням гентаміцину (10 мкг/мл) з подальшим ресуспендуванням [7]. Клітини культивували в поживному середовищі 199, що містило 10 % ембріональної сироватки теляти, 40 мкг/мл гентаміцину у зволоженої атмосфері з 5 % CO<sub>2</sub> при +37 °С.

Для оцінки цитотоксичної дії хлориду нікелю клітини у концентрації  $1,2 \times 10^6$  клітин /мл висаджували у 6-лункові планшети. Через 24 години після посадки клітин хлорид нікелю додавали у культуральне середовище у вигляді водного розчину у концентраціях 100 та 150 мкг/мл. Клітини культивували впродовж 3 діб за присутності іонів нікелю. Проліферативну активність клітин оцінювали мікроскопічно після фарбування трипановим синім. Для визначення функціональної активності культур клітин через кожні 24 години відбирали кондиційне середовище для визначення загального білку, вмісту глюкози, кальцію та фосфору на біохімічному аналізаторі Humalyzer 2000. Дослід проводили у трьох паралелях. Отримані результати обробляли загальноприйнятими статистичними методами з використанням t-критерію Стьюдента та за допомогою пакетів прикладних програм Microsoft Excel.

### Результати досліджень та їх обговорення

Дослідження кінетики росту культури клітин яйцепроводів за умов інкубації з хлоридом нікелю показали, що обидві досліджувані концентрації знижують проліферативний ріст клітин упродовж культивування (рис. 1).

Однак, інгібування росту клітин при додаванні нікель хлориду у концентрації 150 мкг/мл було більш вираженими. Так, на 24 годину культивування кількість клітин у 2-й дослідній групі була вірогідно нижчою ( $P<0,001$ ) порівняно з контрольною групою. Після 48 годин культивування у обох дослідних групах спостерігалася тенденція до зниження активності проліферативних процесів клітин яйцепроводів. На 72 годину культивування відмінності в концентрації клітин між контрольною і дослідними групами були значними та вірогідними ( $P<0,001$ ;  $P<0,001$ ).

Результати наших досліджень підтверджуються дослідженнями інших авторів про цитотоксичність іонів нікелю на епітеліальні клітини у вищих концентраціях [13, 19], тоді, як нижчі дози здатні ініціювати проліферацію клітин. Так, в експериментах на культурі клітин показано, що нікель хлорид проявляє цитотоксичний ефект у дозі вище 0,75мМ. Нижчі концентрації  $NiCl_2$  (0,25 до 0,5 мМ) викликають арест G0/G1 фази, тоді як більш високі концентрації (від 0,5 до 2 ммоль) призводять як до затримки клітинного циклу у фазі S і G2 / M, так і до індукції апоптозу в культурі клітин [10].

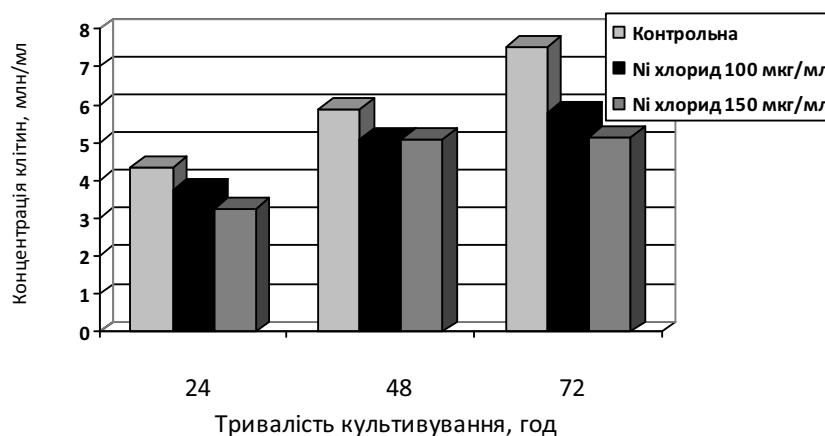


Рис.1. Ефект нікель хлориду на проліферативний ріст культури клітин яйцепроводів упродовж 72 годин культивування.

Результати проведених біохімічних досліджень культурального середовища показали, що вміст загального білка в культуральному середовищі впродовж 72 годин культивування в обох дослідних групах знижується в порівнянні з контрольною групою (табл. 1).

Таблиця 1

Динаміка вмісту загального протеїну у кондиційному середовищі за інкубації клітин яйцепроводів з нікель хлоридом упродовж 72 годин культивування,  $M \pm m$ ,  $n=3$

Біохімічні показники кондиційного середовища	Групи / тривалість культивування		
	24 години	48 годин	72 години
Протеїн, г/л	Культуральне середовище		
	11,7±0,4	11,7±0,4	11,7±0,4
	Контроль		
	18,3±0,48	13,7±0,27	15,4±0,3
	D <sub>1</sub> (хлорид нікелю 100 мкг/мл)		
12,1±0,2	14,7±0,65*	14,3±0,2**	
D <sub>2</sub> (хлорид нікелю 150 мкг/мл)			
14,1±0,33**	13,2±0,23*	13,4±0,24**	

Примітка: у цій та наступній таблицях вірогідні різниці дослідних груп по відношенню до контролю: \* –  $P<0,05$ ; \*\* –  $P<0,01$ ; \*\*\* –  $P<0,001$ .

Виявлено вірогідне зниження вмісту глюкози впродовж культивування. Так, вміст глюкози після 24 годин культивування становив 5,4 г/л у контрольній групі та 5,1 та 5,2 г/л у дослідних групах при застосуванні хлориду нікелю в дозі 100 мкг/мл та дозі 150 мкг/мл.

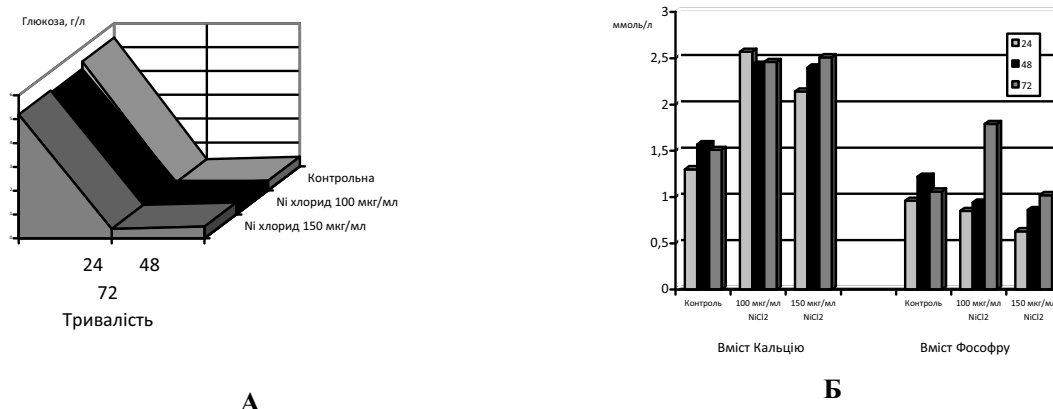


Рис. 2. Показники метаболізму культури клітин яйцепроводів на 24, 48 та 72 години культивування за умов інкубації з нікель хлоридом у різних концентраціях: (А) концентрація глюкози (г/л) та (Б) вміст Кальцію та Фосфору в кондиційному середовищі (ммоль/л).

Через 48 та 72 години культивування вміст глюкози знижувався в дослідних та контрольній групі до рівня 0,3–0,5 г/л. Виявлені зміни, очевидно, пов'язані з інтенсивним використанням глюкози як енергетичного субстрату клітинами при інтенсивному проліферативному рості клітин контрольної та дослідних груп упродовж 72 годин культивування.

Після 24–48 годин культивування спостерігається зниження вмісту фосфору у дослідних групах порівняно з відповідним показником контрольної групи, причому у дослідній групі при експозиції вищої концентрації нікель хлориду ці дані статистично вірогідні. Тоді як через 72 години культивування у дослідній групі при додаванні 100 мкг/мл нікель хлориду відмічено вірогідне зростання вмісту фосфору в порівнянні з контролем.

На відміну від контрольної групи в обох дослідних групах спостерігається вірогідне підвищення вмісту кальцію в культуральному середовищі впродовж культивування. Так, вміст кальцію в дослідній групі з додаванням 100 мкг/мл хлориду нікелю після 24 годин культивування зростає до  $2,57 \pm 0,22$  ммоль/л ( $P < 0,05$ ) при показнику контрольної групи  $1,30 \pm 0,02$  ммоль/л. Через 72 години культивування вміст кальцію в кондиційному середовищі підвищується до  $2,46$  ммоль/л ( $P < 0,05$ ), тоді як в контрольній групі становить  $1,51 \pm 0,09$  ммоль/л. Очевидно, іони нікелю у високих дозах блокуючи цитоплазматичні рецептори мембран, змінюють їх проникність, що призводить до виходу кальцію з клітини, знижує транспорт речовин із культурального середовища в клітину і тим самим змінює проліферативну активність клітин.

### Висновки

Встановлено залежність впливу нікель хлориду від дози та тривалості дії сполуки. Результати досліджень показали, що хлорид нікелю у концентраціях 100 та 150 мкг/мл викликає інгібування проліферативного росту клітин яйцепроводів корів: вища концентрація істотно знижує виживання клітин, їх здатність до поділу та функціональну активність культури.

Експериментальні дослідження біохімічних показників кондиційного середовища показали, що хлорид нікелю в досліджуваних дозах знижує в клітинах епітелію яйцепроводів корів рівень споживання глюкози, змінює рівень кальцію, знижує інтенсивність споживання фосфору клітинами, що сповільнює обмінні процеси і викликає інгібування проліферативного росту клітин.

1. *Вайсерман О. М.* Епігенетичне "програмування" залежних від віку захворювань /О. М. Вайсерман, Л. В. Мехова, В. П. Войтенко //Пробл. старения и долголетия. — 2014. — Т. 23, № 3. — С. 215—239.
2. *Веропотвелян П.М.* Мікроелементи та вагітність /П.М. Веропотвелян, М.П. Веропотвелян, О.М. Капаліна, П.С. Горук// Педіатрія, акушерство та гінекологія. — 2012. — № 2. —С. 95—100.
3. *Гринцова Н. Б.* Функціональний стан гіпофізарно-яєчникової системи статевозрілих щурів за умов довготривалого впливу солей важких металів та негормональної корекції /Н. Б. Гринцова, А. М. Романюк //Scientific Journal «ScienceRise:Biological Science». — 2017. — №3(6). — С. 4—7.
4. *Дрогомирецька І.З.* Імунотоксичність нікелю та його сполук /І.З. Дрогомирецька, І.В. Мазепа., М.А. Мазепа //Современные проблемы токсикологи. — 2009. —№ 3-4. — С. 25—31.
5. *Романюк А.М.* Особливості обміну мікроелементів у щитовидній залозі при проліферативних захворюваннях в у мовах солей важких металів /А.М. Романюк, Р.А. Москаленко //Вісник СумДУ. Серія Медицина. — 2007. —№ 1. — С. 9—13.
6. Романюк А.М. Поширеність важких металів у навколишньому середовищі та їх роль у життєдіяльності організму (огляд літератури) /А.М. Романюк, В.В. Сікора, Ю.М. Линдіна //Буковинський медичний вісник. — 2017. — Т. 21, № 2(82), ч. 1. — С. 145—150.
7. *Мадіч А.В., Шеремета В.І., Гевкан І.І., Федорова С., Штапенко О.В.,Сливчук Ю.І.* Клітинні культури і можливості їх використання в ембріональній біотехнології //Навчально-методичний посібник. — К.:АртЕконом, 2012. — 144 с.: іл.
8. *Файзуллаева З. Р.* Фармакологические и микробиологические аспекты комплексного соединения никеля с пиридоксимом и амидом никотиновой кислоты /З. Р. Файзуллаева, А. А. Абзалов, М. Х. Шамшиддинова, Х. У. Алиев //Современные проблемы науки и образования. — 2016. — № 2. — С. 2.
9. *Яковлева М. Н.* Генотоксические эффекты соединения никеля и возможности модификации никель\_индуцированного мутагенеза в клетках человека /М. Н. Яковлева, Е. В. Перминова //Токсикол. вестн. — 2007. — № 4. — С. 19—22. 14.
10. *D'Antò V.* Effect of nickel chloride on cell proliferation /V. D'Antò1, R. Valletta, M. Amato, H. Schweikl, M. Simeone, S. Paduano, S. Rengo, G. Spagnuolo //The Open Dentistry Journal. — 2012. — Vol.6. — P. 177—181.
11. *Ding J.* Effects of nickel on cyclin expression, cell cycle progression and cell proliferation in human pulmonary cells /J. Ding, G. He, W. Gong, W. Wen, W. Sun, B. Ning, S. Huang, K. Wu, C. Huang, M. Wu //Cancer Epidemio.l Biomarkers Prev. — 2009. — 18(6). doi:10.1158/1055-9965.EPI-09-0115.
12. *Forgacs Z.* Specific amino acids moderate the effects on Ni<sup>2+</sup>on the testosterone production of mouse leydig cells in vitro / Z. Forgacs //Toxicol. Environ. Health A. — 2001. — Vol. 62(5). — P. 349—358.
13. *Gursoy U. K.* The role of nickel accumulation and epithelial cell proliferation in orthodontic treatment-induced gingival overgrowth /U. K. Gursoy, O. Sokucu, V-J. Uitto, A. Aydin, S. Demirer, H. Toker, O. Erdem, A. Sayal //Eur J Orthod. — 2007. — 29(6). — P. 555—558.
14. *Murlooney S.B.* Nickel uptake and utilization by microorganism /S.B. Murlooney, R.P. Hausinger //FEMS Microbiology Reviews. — 2003. — Vol. — 27. — P.239—261.
15. *Perfetto B.* Analysis of the signal transduction pathway of nickel-induced matrix metalloproteinase-2 exptression in the human keratinocytes in vitro: prelim-inary findings /B. Perfetto, M. Lamberti, M. T. Giuliano //J. Cutan. Pathol. — 2006. — Vol. 34(6). — P. 441—447.
16. *Ouyang W.* Soluble and insoluble nickel compounds exert a differential inhibitory effect on cell growth through IKKalpha-dependent cyclin D1 downregulation /W. Ouyang, D. Zhang, J. Li, U.N. Verma, M. Costa, C. Huang //J. Cell Physiol. — 2009. — Vol. 21(8). — P. 205—14.
17. *Reik W.* Epigenetics: Cellular memory erased in human embryos /W. Reik, G. Kelsey //Nature. — 2014. — 511. — P. 540—541.
18. *Silbergeld E. K.* Lead as a carcinogen: experimental evidence and mechanisms of action /E. K. Silbergeld, M. Waalkes, J. M. Rice //Am. J. Ind. Med. — 2000. — 38. —P. 316—323.
19. *Trombetta D.* Toxic effect of nickel in an in vitro model of human oral epithelium /D. Trombetta, M. R. Mondello, F. Cimino, M. Cristiani, S. Pergolizzi, A. Saija //Toxicology Letters. — 2005. — 159. — P. 219—225.
20. *Wang Y.* Nickel-refining fumes induced DNA damage and apoptosis of NIH/3T3 cells via oxidative stress /Y. Wang, S.-Y. Wang, L. Jia, L. Zhang, J.-C. Ba, D. Han, C.-P. Yu, Y.-H. Wu //Int. J. Environ. Res. Public Health. — 2016. — 13. — P. 629; doi:10.3390/ijerph13070629.

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

Институт биологии животных НААН, Львов

ВПЛИВАННЯ ХЛОРИДА НИКЕЛЯ НА МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ І МЕТАБОЛІЧЕСЬКІ ХАРАКТЕРИСТИКИ КЛІТОК *IN VITRO*

Исследована зависимость роста и метаболических изменений в клетках яйцеводов коров при различной концентрации хлорида никеля. Показано, что обе концентрации хлорида никеля 100 и 150 мкг/мл вызывают снижение пролиферативного роста клеток яйцеводов в течение 72 часов культивирования, однако более выраженное влияние выявлено при более высокой дозе.

Снижение интенсивности пролиферации клеток, обусловленное хлоридом никеля сопровождалось изменениями метаболических процессов в культуре клеток. Выявлено, что высокая концентрация достоверно снижает выживаемость клеток, их способность к делению ( $p < 0.001$ ), снижает интенсивность потребления фосфора ( $p < 0.001$ ) и достоверно повышает содержание кальция ( $p < 0.01$ ).

*Ключевые слова:* культура клеток *in vitro*, никель хлорид, пролиферация, цитотоксичность

O. V. Shtapenko, Yu. I. Slyvchuk, I. I. Gevkan

Institute of Animal Biology NAAS, Lviv, Ukraine

INFLUENCE OF NICKEL CHLORIDE ON MORPHOFUNCTIONAL AND METABOLIC CHARACTERISTICS OF CELLS *IN VITRO*

Increasing pollution of the environment by heavy metal compounds have harmful effects on living organisms, they could lead to disorders of many physiological functions, in particular, reproductive system. Nickel is a cofactor of some cellular enzymes,  $Ni^{2+}$  ions stabilize the structure of nucleic acids and ribosomes, however at the high concentrations he become noxious. The dependence of growth and metabolic changes in the cells of the oviducts of cows at different concentrations of nickel chloride was evaluated. Research was performed on a primary culture of ovine oviduct epithelial cells (BOECs). For experiments, BOECs were seeded into a 35-mm Petri dish at  $1.2 \times 10^6$  cells per dish in TCM-199 and 40  $\mu\text{g/mL}$  gentamicin supplemented with 10% of fetal bovine serum. Water soluble salt of nickel chloride was added to the cell culture at concentrations of 100 and 150  $\mu\text{g/ml}$ , 24 hours after the passing. Using the cellular viability parameters (cell growth and proliferation) and metabolic cell parameters (concentration of total protein, glucose levels, calcium and phosphorus content) the vitality of BOECs *in vitro* after treatment with nickel chloride over 72 hours incubation periods was studied.

Experimental studies demonstrated that proliferation activity oviduct cells treated with nickel chloride decreased under 72 h over controls, however addition of 150  $\mu\text{g/ml}$  nickel chloride lead to more destructive changes in a cell culture.

The decrease the intensity of cell proliferation by the influence of nickel chloride is confirmed by changes of metabolic processes in culture of oviduct cells. At 48 and 72 hours, the content of total protein a statistically ( $P < 0,01$ ;  $P < 0,001$ ) decreased in both experimental groups compared to the control. It was found that the higher concentration significantly decreases the survival of cells, their ability to divide ( $P < 0,001$ ), reduces the intensity of phosphorus consumption ( $P < 0.001$ ) and significantly increases the calcium content ( $P < 0,01$ ).

A decrease in the glucose content in all stages of the cellular cultivation for control and both experimental groups was observed. These results show that nickel chloride in experimental concentrations have no cytotoxic effect on BOECs because the evaluation of glucose uptake is crucial in the study of cell viability and numerous metabolic disorders.

Experimental studies demonstrated time-dependent effect of nickel chloride on the BOECs. It was shown that both concentrations of nickel chloride 100 and 150  $\mu\text{g/ml}$  caused a decrease in the proliferative growth of bovine oviduct cells during 72 hours of cultivation, however, a more pronounced effect was detected at a higher dose.

*Key words:* *in vitro* cell culture, nickel chloride, proliferative activity, cytotoxicity

Рекомендує до друку

Н. М. Дробик

Надійшла 09.11.2017