

ИЗУЧЕНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ГЕНОТОКСИЧНОСТИ ИОНОВ НИКЕЛЯ В ОТНОШЕНИИ МОНОНУКЛЕАРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДИКИ FAST MICROMETHOD

Титов П.Л., Моисейчик П.Н., Богдан Г.П.

Кафедра ортопедической стоматологии, УО «Белорусский государственный медицинский институт», Беларусь, Минск.

Никель широко используется при производстве стоматологических материалов и инструментов. Никель является базовым металлом и в различных количествах может присутствовать в благородных, полу- и неблагородных сплавах, применяемых при изготовлении съемных и несъемных зубных протезов, ортодонтических аппаратов. Невысокая стоимость сплавов на основе никеля и хорошие технологические свойства позволили им в настоящее время занять доминирующее положение на рынке стран Восточной Европы и бывшего СССР.

Для изготовления современных эстетических (металлокерамических и металлопластмассовых) конструкций на литых каркасах широко используются Ni-Cr, Ni-Cr-Be и Ni-Cr-Mo сплавы, содержание никеля и хрома в которых составляет соответственно около 62-82% и 11-22%. В гораздо меньших количествах в этих сплавах присутствуют молибден, бериллий, алюминий, кобальт, железо и др.. В небольших количествах никель добавляют в некоторые золотосодержащие сплавы для улучшения их физических характеристик. Никель содержится в некоторых припоях из белого золота (AuNiZn) и в припоях для пайки неблагородных сплавов. 8-10 % никеля содержится в стали, используемой для производства стальных эндодонтических инструментов и ортодонтической проволоки. Никель содержится в сплавах, используемых для изготовления ортодонтических дуг – Ni-Ti (“NiTinol” – 55% Ni), Co-Cr-Ni (“Elgiloy” – 15% Ni).

Биологическая среда полости рта предоставляет практически идеальные условия для поддержания процессов биodeградации дентальных сплавов – частые изменения pH и температуры в широком диапазоне значений, действие различных химических веществ и ферментов полости рта, влияние оральной микрофлоры. Достаточно большое количество исследований указывает на тот факт, что, подвергаясь процессам коррозии и механического износа, металлосодержащие конструкции выделяют ионы металлов в среду полости рта. Катионы металлов, распределяясь в полости рта, или системно играют ключевую роль в развитии неблагоприятных эффектов дентальных сплавов.

Никель, наряду с такими металлами, входящими в состав неблагородных дентальных сплавов, как кобальт и хром, является сильным аллергеном и может провоцировать местные (локализованные гингивиты, лишеноидные поражения слизистой оболочки синдром “горящего рта” и др.) и общие аллергические реакции (контактные дерматиты, астма). Ионы этих металлов могут также индуцировать развитие таких негативных биологических эффектов, как локальная цитотоксичность и, возможно, генотоксичность.

Индивидуальные генотоксические и мутагенные эффекты изолированных ионов металлов изучаются на эукариотических и прокариотических тест-системах. Как правило, сами ионы металлов не повреждают ДНК, но они индуцируют образование свободных радикалов, которые и нарушают целостность ДНК. Нарушение процесса восстановления ДНК и канцерогенный эффект описаны в отношении ионов Cd^{2+} , Ni^{2+} и Co^{2+} . Кроме того, ионы Ni усиливают генотоксический эффект на клетки физического воздействия.

Целью настоящего исследования являлось изучение генотоксичности разными концентрациями NiSO_4 в зависимости от времени экспозиции по оценке частоты повреждений (разрывов) ДНК мононуклеаров периферической крови.

Материалы и методы.

Материалы. Материалом для исследования служила периферическая кровь 21 донора. Кровь забирали натощак в утреннее время в стерильные центрифужные пробирки и доставляли в лабораторию. Жизнеспособность лимфоцитов составляла 95- 98%.

Раствор $\text{NiSO}_4 \times 6\text{H}_2\text{O}$. Раствор соли добавляли в культуру клеток до концентрации 50, 100, 250 и 300 мМ/мл.

Культивирование мононуклеаров периферической крови. Культивирование опытных и контрольных проб клеток каждого индивидуума осуществляли в лунках 96 луночных микропланшетах.(по три повтора) на каждую концентрацию и время экспозиции. Пробы культивировали в условиях CO_2 инкубатора в течение 3 и 6 часов. Контролем служили пробы культуры клеток, не содержащие соли никеля.

Определение одноцепочечных разрывов ДНК. Интенсивность образования одноцепочечных разрывов ДНК (ssDNA, single-stranded DNA) лимфоцитов периферической крови определяли по методике Fast Micromethod[®] с использованием специального флуоресцирующего красителя – “PicoGreen” (Molecular Probes Inc). Через каждые 20 секунд измеряли флуоресценцию комплексов “PicoGreen” + место разрыва ДНК и на основе кинетики гашения флуоресценции далее по специальной формуле определяли суммарные показатели коэффициентов множественных разрывов ДНК (SSF, Strand Scission Factors).

Коэффициент множественных разрывов ДНК (SSF). Коэффициент множественных разрывов ДНК представляет собой \log_{10} соотношения содержания разрывов ДНК в опытном образце к содержанию разрывов ДНК в контрольном образце:

$$\text{SSF} = \log_{10} (\% \text{ssDNA}_{\text{опытного образца}} / \% \text{ssDNA}_{\text{контрольного образца}})$$

Таким образом, $\text{SSF}=0$ указывает на отсутствие дополнительных разрывов цепочки ДНК в опытном образце по сравнению с контрольным. $\text{SSF}<0$ указывает на увеличение частоты разрывов ДНК в опытном образце культуры клеток. Для удобства расчета статистических данных значения SSF представлены далее в виде $\text{SSF}_x(-1)$.

Статистическая обработка данных. Статистический анализ результатов исследования проводили, используя компьютерные программы Microsoft Excel и StatSoft STATISTICA 6.0 с расчетом средней и стандартной ошибки среднего

($M \pm m$), критерия Стьюдента (t). Критическое значение уровня значимости принималось равным 5% ($P < 0,05$).

Результаты и их обсуждение.

Проведенное исследование свидетельствует о некотором повышении частоты разрывов ДНК лимфоцитов периферической крови при культивировании клеток в присутствии 250 мМ NiSO₄ в течение трех часов и 50 мМ при 6 часовом воздействии. Вместе с тем, как видно, из приведенных в таблице данных статистически достоверных различий между показателями разрывов ДНК в зависимости от концентрации используемой соли и времени экспозиции не выявлено ($P > 0,05$).

Полученные данные свидетельствуют, что у первой группы доноров с низким показателем разрывов при 3-х часовом культивировании отмечается некоторое повышение показателя разрывов при увеличении концентрации соли, в тоже время как при 6-ти часовой инкубации при повышении концентрации соли никеля и длительности экспозиции определенной динамики не отмечается. У лиц второй группы со средними значениями SSF как при 3-х, так и при 6-ти часовой инкубации он практически не изменялся ($P > 0,05$). В 3-ей группе лиц в высокими исходными значениями показателя разрывов при 3-часовой инкубации по мере повышения концентрации отмечается тенденция к снижению, а при 6-ти часовой инкубации к его увеличению в зависимости от концентрации соли ($P < 0,05$). Полученные результаты указывают на повышение частоты одноцепочечных разрывов ДНК под влиянием возрастающих концентраций сульфата никеля и времени экспозиции, что в свою очередь указывает на его генотоксичность.

Вполне понятно, что индивидуумы с высокостабильным геномом и высокой адаптивностью репарационных процессов способны быстро устранять образовавшиеся в результате воздействия солей никеля разрывы ДНК, о чем может свидетельствовать повышение показателей SSF у лиц третьей группы, а также незначительные их колебания у лиц второй группы. Лимфоциты лиц первой группы характеризовались, вероятно, более высокой чувствительностью к генотоксическому воздействию NiSO₄, о чем свидетельствует снижение этого показателя.

Полученные нами результаты по определению повреждений ДНК методикой Fast Micromethod® свидетельствуют о влиянии разных концентраций и времени экспозиции сульфата никеля на частоту разрывов ДНК, а также о существовании значительного варьирования геночувствительности/генорезистентности в популяции и разной динамике показателя в группах лиц чувствительных и резистентных. Применение в этих целях количественного определения одноцепочечных разрывов ДНК лимфоцитов по показателям SSF позволяет устранить многие методические проблемы, повышает стандартизуемость исследований. Используемый нами метод (Fast Micromethod®) может найти широкое применение как при оценке генотоксического эффекта компонентов разрабатываемых дентальных сплавов, так и при индивидуальном подборе стоматологических материалов и в решении вопроса их индивидуальной биосовместимости.

