

**ОБЩИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ СИНЕРГИЧЕСКОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ
ТЯЖЁЛЫХ МЕТАЛЛОВ С ГИПЕРТЕРМИЕЙ ИЛИ ИОНИЗИРУЮЩИМ
ИЗЛУЧЕНИЕМ**

Толкаева¹ М.С., Евстратова² Е.С., Петин¹ В.Г.

¹МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России,
Калужская область, г. Обнинск,

²ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Калужская область, г. Обнинск,
e-mail: marya.tolkaeva@yandex.ru

Резюме. Работа посвящена изучению проявления синергизма при одновременном взаимодействии солей тяжёлых металлов и гипертермии. Показано, что синергическое взаимодействие наблюдается лишь в определённом диапазоне действующих температур и концентраций тяжелых металлов, которые могут быть разным для различных условий комбинированных воздействий. При этом регистрируются оптимальные температуры или концентрация тяжелого металла, при которых наблюдается максимальное синергическое взаимодействие. Выявлена зависимость синергизма от концентрации тяжёлых металлов. Показано, что чем меньше эта концентрация, тем при меньшей температуре регистрируется максимальный синергический эффект. Эти данные могут рассматриваться как указание на потенциальную значимость синергического взаимодействия при малых концентрациях вредных веществ, важных для проблем экологии. Качественная интерпретация полученных результатов обсуждается.

Ключевые слова: синергизм, гипертермия, тяжёлые металлы, коэффициент синергического усиления, концентрация препарата.

**GENERAL PATTERNS OF SYNERGISTIC INTERACTION OF HEAVY METALS
WITH HYPERTHERMIA OR IONIZING RADIATION**

M.S. Tolkaeva¹, E.S. Evstratova², V.G. Petin¹

¹A. Tsyb Medical Radiological Research Center – branch of the National Medical
Research Radiological Center of the Ministry of Health of the Russian Federation,
Obninsk, 249031, Kaluga region, Russia

²Federal State Budgetary Institution Scientific Research Center for Radiology of the
Ministry of Health of Russia, Kaluga Region, Obninsk, e-mail: marya.tolkaeva@yandex.ru

Abstract. The work is devoted to the study of the synergistic effect display after the simultaneous interaction of heavy metal salts and hyperthermia. It is shown that synergistic interaction is observed only in a certain range of acting temperatures and concentrations of heavy metals, which can be different for various conditions of combined treatments. In this case, the optimum temperature or concentration of the heavy metal is recorded at which the greatest synergistic interaction is observed. The dependence of synergism on the concentration of heavy metals was revealed. It was shown that the lower this concentration, the lower the greatest synergistic effect recorded. These data can be considered as an indication of the potential significance of synergistic interactions at low concentrations of harmful substances that are important for environmental problems. A qualitative interpretation of the results obtained is discussed.

Key words: synergism, hyperthermia, heavy metals, synergistic enhancement ratio, drug concentration.

Введение.

Известно, что при комбинированном действии двух физических или химических агентов окружающей среды они могут усиливать вредное действие друг друга, когда суммарный биологический эффект больше ожидаемого при независимом сложении эффектов от каждого агента, применяемого индивидуально. В этом случае говорят о синергическом взаимодействии [6], которое изучается синергетикой. Синергетика переводится как «совместное действия» (от *греч.* «син» – совместно и «эргос» – действие). Одновременное воздействие на человека и биосферу различных вредных факторов окружающей среды является объективной реальностью современного мира. Синергические взаимодействия факторов окружающей среды представляют особую опасность, поэтому анализ общих закономерностей проявления синергизма является актуальной задачей современной радиобиологии и экологии. Известно, что синергическое взаимодействие повышенной температуры с ионизирующей радиацией или химическими соединениями нашло практическое применение в прикладных аспектах радиобиологии, например в онкологии, пищевой промышленности, стерилизации различных отходов и других направлениях. Гипертермия позволяет при меньших дозах ионизирующего излучения добиться некроза опухоли. В лечебных целях гипертермию создают локально в области опухоли. Однако более широко известны вредные последствия синергических взаимодействий. Например, многочисленные химические вещества, загрязняющие почву, водоемы и воздух, сами являются токсическими агентами, оказывающими вредное воздействие на биосферу в целом и на человека в частности, являясь канцерогенами,

вызывающими патологические изменения в организме человека или приводящие к возникновению злокачественных опухолей [1, 4].

Около 15% территории Российской Федерации характеризуется сложной экологической обстановкой [1, 3]. Установлено проявление синергических эффектов и для человека, например, при комбинированном действии низких мощностей доз ионизирующего излучением с химическими веществами [5] или электромагнитными полями СВЧ диапазона [10]. Наиболее изученным является значимость синергического взаимодействия повышенного фона УФ света, обусловленного истощением озонового слоя в стратосфере, с температурой окружающей среды, повышающего выход онкологических заболеваний кожи и заболевания глаз [2]. Из эпидемиологических и токсикологических исследований хорошо известно, что взаимодействие курения табака и радона может быть синергическим [13], частота рака легких и гортани у шахтеров курильщиков в 2–3 раза выше, чем у некурящих [11].

Комбинированные действия различных факторов окружающей среды достаточно широко изучены на микроорганизмах и культивируемых клетках млекопитающих нормального и злокачественного происхождения, а также на различных модельных системах тканей и опухолей [8, 14]. При этом выявлено существование некоторых общих закономерностей проявления синергизма, которые не зависят от используемого биологического объекта и регистрируемого теста, а также от природы физических и химических факторов, используемых при комбинированных воздействиях. Прежде всего, следует обратить внимание на факт, что синергическое взаимодействие может не наблюдаться при любых, случайно выбранных параметрах действующих агентов. Так, для одновременного действия гипертермии с ионизирующим излучением, УФ светом, ультразвуком и различными химическими веществами синергизм проявляется лишь в определенном температурном диапазоне, причем для более термочувствительных объектов он регистрируется в области относительно небольших температур и, наоборот, для терморезистентных спор бактерий синергизм наблюдается лишь в области очень высоких температур. Во всех случаях имелось оптимальное значение температуры или другого фактора, используемого в комбинации, при котором достигается максимальное синергическое усиление. Вторая универсальная закономерность – синергизм зависит от интенсивности применяемых агентов. Было продемонстрировано, что с уменьшением интенсивности одного из агентов, необходимо было уменьшать интенсивность другого агента для обеспечения максимального синергического взаимодействия. Эта закономерность указывает на принципиальную возможность синергического

взаимодействия вредных факторов окружающей среды при низких интенсивностях, реально встречающихся в биосфере.

В настоящее время загрязнение окружающей среды тяжёлыми металлами является актуальной проблемой. К тяжелым металлам относят более 40 химических элементов с большим атомным весом, обладающих свойствами металлов. Биологическое действие тяжелых металлов обусловлено их высокой токсичностью, способностью к биоаккумуляции и возможностью их синергического взаимодействия с различными факторами окружающей среды. Кроме того, некоторые тяжелые металлы используются в сочетании с другими факторами непосредственно в медицине или входят в состав других лекарственных средств. Однако исследования синергического взаимодействия гипертермии с тяжёлыми металлами носят фрагментарный характер и нуждаются в детальном экспериментальном исследовании и теоретической интерпретации.

Цель.

Данная работа посвящена проверке, сохраняются ли перечисленные общие закономерности проявления синергических взаимодействий для тяжелых металлов, используемых в комбинации с ионизирующим излучением или гипертермией.

Материалы и методы.

Объектом исследований были гаплоидные (штамм 3bα) и диплоидные (штамм XS800) дрожжевые клетки *Saccharomyces cerevisiae*, на которых в стационарной стадии роста воздействовали химическими препаратами, содержащими соли тяжелых металлов (платина, свинец, хром) отдельно или одновременно с гипертермией (37–60 °C) или ионизирующим излучением (γ-кванты ^{60}Co , мощность дозы 10,8 Гр/мин). Для количественной оценки степени синергизма мы использовали коэффициент синергического усиления, определяемый отношением изоэффективных доз на теоретически ожидаемой кривой выживаемости, рассчитанной для независимого действия каждого агента, и экспериментально полученной кривой доза-эффект (Петин и др., 2012).

Результаты.

На рис. 1 представлен пример кривых выживаемости гаплоидных дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae*, штамм 3bα: кривая 1 – действие одной повышенной температуры (52 °C); кривая 2 – действие ионизирующего излучения (γ-кванты ^{60}Co , мощность дозы 10 Гр/мин) при комнатной температуре; кривая 3 – рассчитанная кривая

для независимого сложения эффектов от ионизирующего излучения и тепла кривая 4 – экспериментально полученная кривая выживаемости после одновременного действия этих агентов.

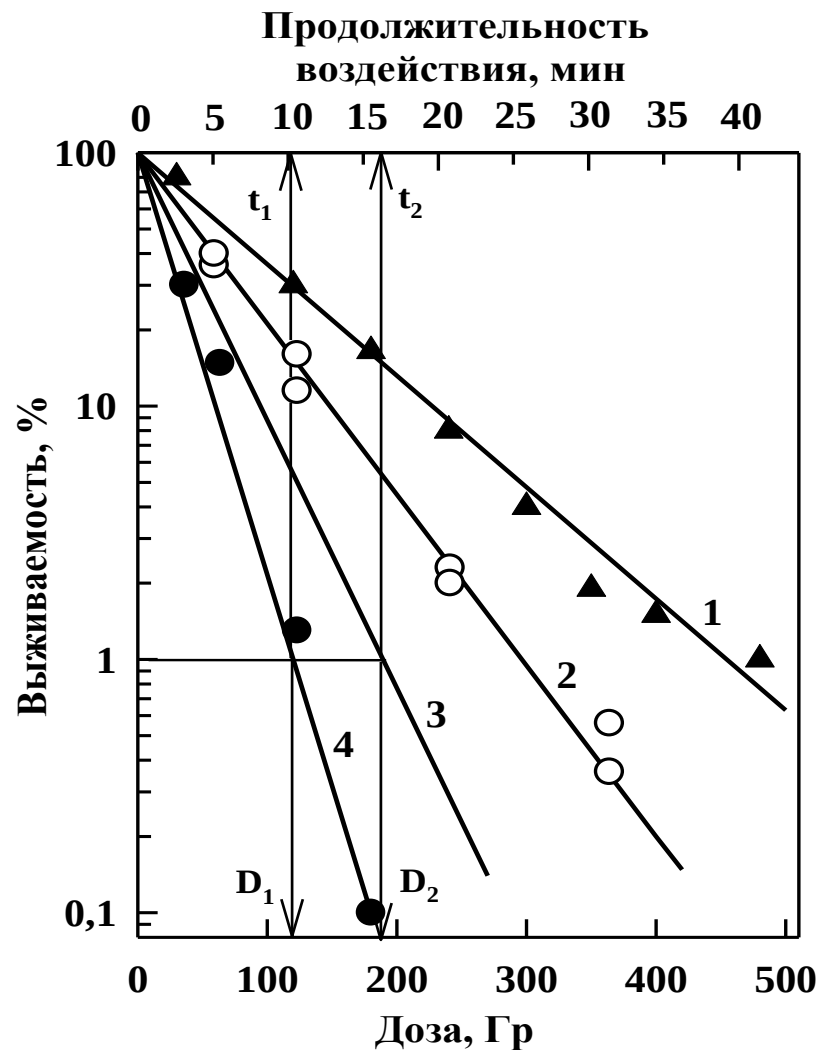


Рис. 1. Кривые выживаемости гаплоидных дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae*, штамм 3bα: кривая 1 – действие одной повышенной температуры (52 °C); кривая 2 – действие ионизирующего излучения (γ-кванты ^{60}Co , мощность дозы 10 Гр/мин) при комнатной температуре; кривая 3 – рассчитанная кривая для независимого сложения эффектов от ионизирующего излучения и тепла; кривая 4 – экспериментально полученная кривая выживаемости после одновременного действия этих агентов

Аналогичные кривые выживаемости были получены для всех условий комбинированных воздействий, использованных в данной работе. Во многих случаях вместо кривых выживаемости после действия ионизирующего излучения были получены кривые выживаемости после действия различных тяжелых металлов. Коэффициент

синергического усиления рассчитывали для любого изоэффективного уровня, например, для выживаемости, равной 1%, по уравнению

$$k = t_2 / t_1 = D_2 / D_1, \quad (1)$$

где t_1 – продолжительность одновременного действия обоих агентов; t_2 – теоретически рассчитанная продолжительность облучения для независимого сложения эффектов от каждого агента, действующего индивидуально.

Поскольку все кривые выживаемости, полученные в данном исследовании были экспоненциальными, значение коэффициента синергического усиления не зависит от уровня выживаемости, для которого он рассчитывается. В данной работе во всех случаях мы оценивали этот коэффициент на уровне 1% выживаемости. Вместо продолжительностей воздействия можно применять соответствующие дозы (D_1 и D_2 , рис. 1). Фактически коэффициент синергического усиления показывает, во сколько раз уменьшилась продолжительность ожидаемого воздействия при независимом сложении эффектов от каждого агента (t_2) по сравнению с наблюдаемой в эксперименте величиной (t_1). Отметим, что при независимом действии агентов вероятность регистрируемого эффекта при действии двух агентов, в соответствии с известным положением теории вероятности [9], определяется не простым суммированием эффектов, а произведением вероятностей эффектов, индуцированных каждым агентом в отдельности.

Приведенный на рис. 1 набор кривых выживаемости был получен в наших исследованиях для всех тяжелых металлов и условий комбинированных воздействий, на основе которых рассчитывали коэффициент синергического усиления. Итоговые результаты представлены в виде зависимости этого коэффициента от условий комбинированных воздействий.

На рис. 2 приведены зависимости коэффициента синергического усиления от температуры, действующей одновременно с растворами различных солей и концентраций тяжелых металлов на выживаемость диплоидных дрожжевых клеток. Видно, что во всех случаях отмечается куполообразная закономерность – синергизм сначала возрастает с увеличением действующей температуры, достигает максимального значения и затем снова уменьшается. Другая важная закономерность следует из сравнения данных, представленных на рис. 2 В и рис. 2 Г – с уменьшением концентрации $K_2Cr_2O_7$ максимум синергического взаимодействия смещается в область более низких температур.

На рис. 3 приведена зависимость коэффициента синергического усиления от действующей температуры после одновременного применения гипертермии с раствором PbI_2 (А, 1 мг/мл) и от концентрации PbI_2 после одновременного действия раствора этой

соли с ионизирующим излучением (^{60}Co , 10,8 Гр/мин) на выживаемость диплоидных дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae*.

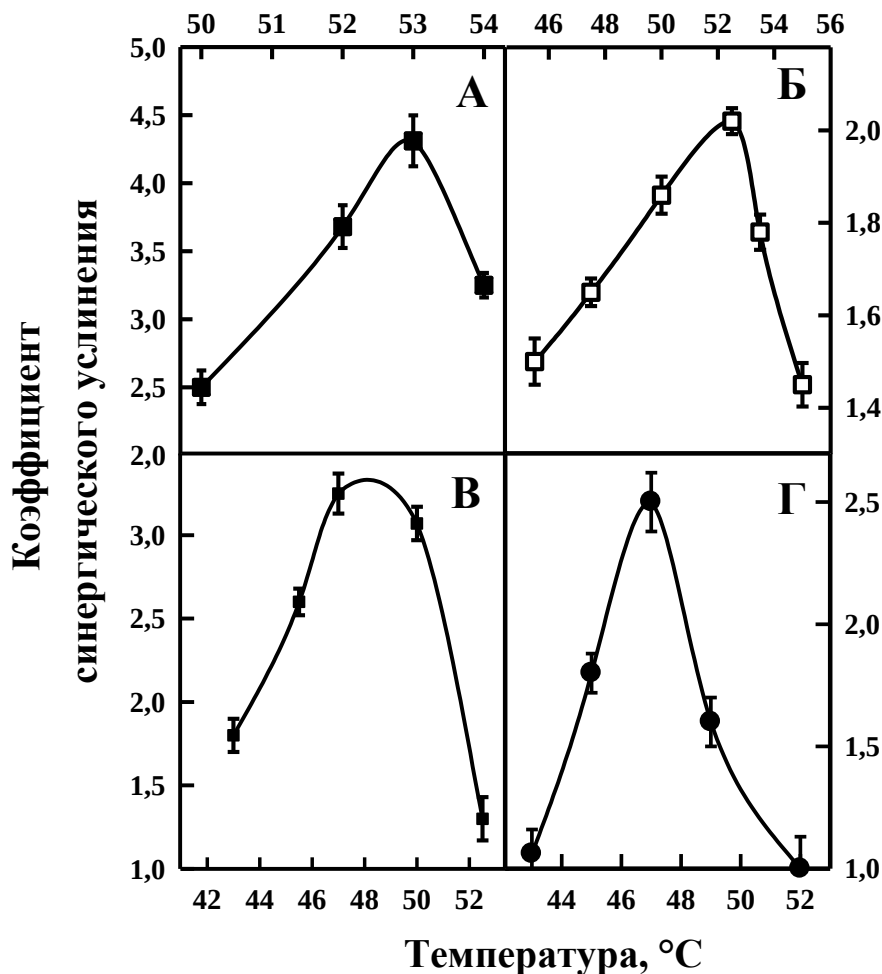


Рис. 2. Зависимость коэффициента синергического усиления от температуры при одновременном действии растворов солей тяжелых металлов: иодид свинца PbI_2 (А – 2,5 мг/мл), цисплатин (Б – 0,25 мг/мл) и дихромат калия $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (В – 5 мг/мл, Г – 0,5 мг/мл) с гипертермией на выживаемость диплоидных дрожжевых клетках *Saccharomyces cerevisiae* (штамм XS800)

Из рис. 3 видно, что и в этом случае наблюдается куполообразные зависимости коэффициента синергического усиления от действующей температуры (А) и концентрации PbI_2 (Б). Любое отклонение действующей температуры или концентрации соли от оптимальных значений, обеспечивающих максимальное синергическое взаимодействие, приводит к снижению эффективности синергического взаимодействия. Другая важная особенность, следующая из сравнения данных, представленных на рис. 3, заключается в том эффективность синергического взаимодействия солей тяжелых металлов с гипертермией значительно меньше, чем с ионизирующим излучением.

Можно отметить, что аналогичные закономерности проявления синергизма наблюдались в наших более ранних публикациях при одновременном комбинированном воздействии гипертермии с ионизирующим излучением, УФ светом, ультразвуком и СВЧ излучением [8, 14].

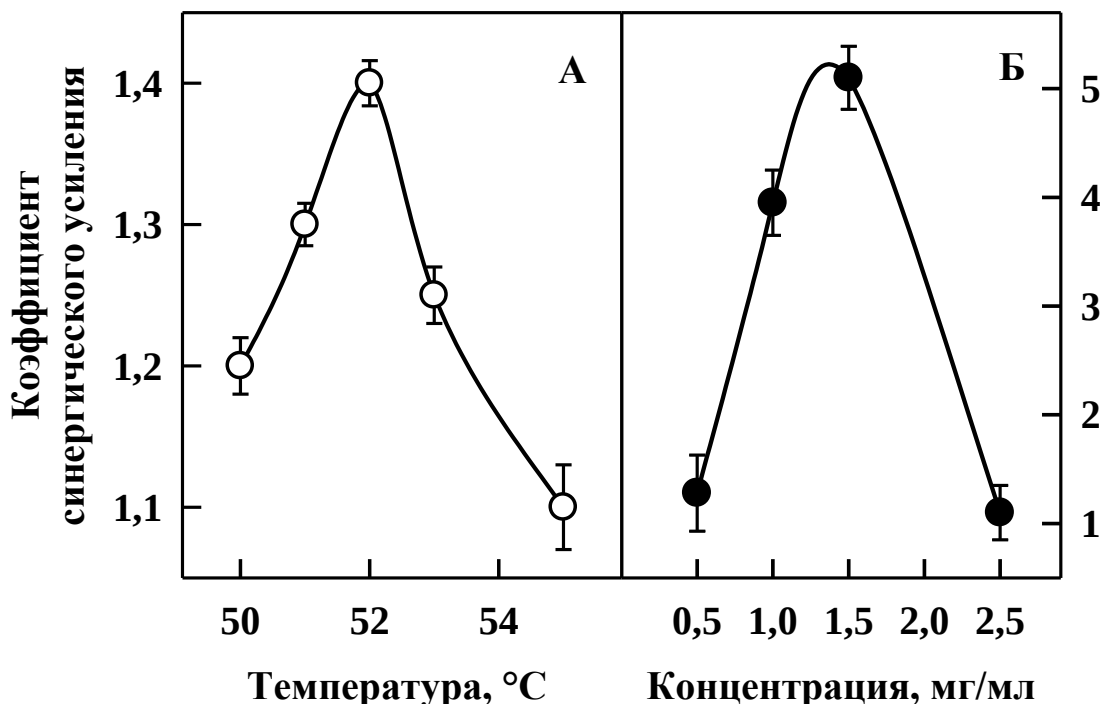


Рис. 3. А – зависимость коэффициента синергического усиления от действующей температуры после одновременного применения гипертермии с иодидом свинца PbI_2 (1 мг/мл) на выживаемость диплоидных дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae* (штамм XS800). Б – зависимость коэффициента синергического усиления от концентрации раствора иодида свинца после его одновременного применения с ионизирующим излучением (^{60}Co , 10,8 Гр/мин) на выживаемость диплоидных дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae* (штамм XS800).

Обсуждение.

В работе получены новые экспериментальные данные, связанные с синергическим взаимодействием солей тяжелых металлов с гипертермией или ионизирующим излучением. Продемонстрировано, что синергизм наблюдается в определённом диапазоне действующих температур или концентрации тяжелых металлов, который может отличаться в зависимости от анализируемых тяжёлых металлов и их концентраций. При этом регистрируется оптимальная температура, при которой наблюдается максимальное

синергическое взаимодействие. Выявлена зависимость синергизма от концентрации тяжёлых металлов. Показано, что чем меньше эта концентрация, тем при меньшей температуре регистрируется максимальный синергический эффект.

Ранее была предложена математическая модель, качественно прогнозирующая отмеченные в данной работе закономерности синергического взаимодействия гипертермии с тяжелыми металлами [8, 14]. В модели постулируется, что синергизм при комбинированных воздействиях обусловлен формированием дополнительных эффективных повреждений, возникающих за счет взаимодействия субповреждений, не эффективных при действии каждого агента в отдельности. Модель не связана с молекулярной природой эффективных повреждений или субповреждений, которые упоминаются, поскольку природа эффективных повреждений и субповреждений могут отличаться для различных биологических объектов и применяемых агентов. В соответствии с этой моделью, максимальное значение коэффициента синергического усиления достигается при равенстве субповреждений от каждого агента. Однако эта модель ранее не применялась для объяснения синергического взаимодействия солей тяжелых металлов с гипертермией или ионизирующим излучением.

Из результатов, представленных в данной работе, очевидно, что при постоянной концентрации солей тяжелых металлов с повышением действующей температуры эффективность синергического взаимодействия вначале возрастает, достигает максимума и затем уменьшается (рис. 2А, Б, В и Г, рис. 3 А). Отсутствие синергического взаимодействия или его небольшое значение при сравнительно небольших температурах обусловлено относительно большим числом химических субповреждений и малым числом термических субповреждений для обеспечения заданной 1% выживаемости (рис. 1). Увеличение коэффициента синергического усиления с дальнейшим повышением действующей температуры обусловлено увеличением числа соответствующих термических субповреждений и постепенное снижение химических субповреждений из-за снижения длительности воздействия. Максимальное значение коэффициента синергического усиления достигается при равенстве термических и химических субповреждений. Дальнейшее повышение действующей температуры приводит к снижению эффекта синергизма из-за прогрессивного уменьшения продолжительности одновременного применения факторов и соответствующего снижения числа субповреждений, сформированных химическим агентом. В этом случае образуется большое число термических повреждений и соответствующих им субповреждений, и

условие достижения максимального синергизма снова нарушается вплоть до его полного отсутствия.

Похожая интерпретация может быть использована для интерпретации результатов, полученных при постоянной мощности дозы ионизирующего излучения и изменении концентрации соли PbI_2 (рис. 3, Б). Отсутствие синергического взаимодействия или его небольшая эффективность при низких значениях концентраций PbI_2 может быть следствием большого числа повреждений от ионизирующего излучения из-за сравнительно длительного облучения при значительно меньшем вкладе солей тяжелых металлов в инактивацию клеток. Максимальный синергический эффект наблюдается при равенстве субповреждений от каждого агента. При дальнейшем повышении концентрации PbI_2 образуется большее число летальных повреждений от химического фактора и соответствующих им субповреждений, ответственных за синергизм, поэтому эффективность синергического взаимодействия значительно уменьшается из-за отсутствия равенства субповреждений от каждого агента.

В целом, приведенные в данной работе результаты в совокупности с ранее опубликованными данными [8, 14, 7, 12] указывают на универсальность проявления максимального синергического взаимодействия и его зависимости от интенсивности применяемых физических факторов или концентрации химических агентов. Эти закономерности имеют не только фундаментальное значение, но и должны учитываться на практике для оптимизации комбинированных воздействий различных агентов и при оценке безопасности окружающей среды.

Литература

1. Арский Ю.М., Данилов–Данильян В.И., Залиханов М.И. и др. Экологические проблемы: что происходит, кто виноват и что делать? М.: МНЭПУ, 1997. 330 с.
2. ВОЗ. Ультрафиолетовое излучение. Женева, 1995. – 394 с.
3. Вронский В.А. Прикладная экология. Ростов–на–Дону: Феникс, 1996. 512 с.
4. Данилов–Данильян В.И., Горшков В.Г., Арский Ю.М. и др. Окружающая среда между прошлым и будущим: мир и Россия (опыт эколого–экономического анализа). М.: ВИНТИ, 1994. 134 с.
5. Додина Л.Г. Нарушение здоровья населения и механизмы адаптации в условиях воздействия антропогенных факторов малой интенсивности. Автореф. докт. дисс. Санкт–Петербург, 1998.

6. Доклад 30 МКРЕ. Количественные закономерности и дозиметрия в радиобиологии. М.: Энергоатмиздат, 1984. 104 с.
7. Евстратова Е.С., Петин В.Г. Биофизическая интерпретация зависимости синергизма от интенсивности применяемых агентов // Биофизика. 2018. Т. 63. Вып. 6. С. 1186–1194.
8. Петин В.Г., Жураковская Г.П., Комарова Л.Н. Радиобиологические основы синергических взаимодействия в биосфере. М.: ГЕОС, 2012. 219 с.
9. Феллер В. Введение в теорию вероятностей и её приложения. М.: Мир, 1967. 765 с.
10. Шубик В.М., Колотвин В.А., Либерман А.Н. и др. Влияние сочетанного СВЧ и рентгеновского облучения на иммунологическую реактивность // Гигиеническая оценка факторов радиационной и нерадиационной природы и их комбинаций / Под ред. А.Н. Либермана. – Л.: Минздрав РСФСР, 1976. – С. 42–44.
11. Archer V.E. Enhancement of lung cancer by cigarette smoking in uranium and other miners // Carcinogenesis. 1985. V. 8, № 1. P. 23–37.
12. Evstratova E.S., Petin V.G., Zhurakovskaya G.P. Synergistic effects and their potential significance for the influence of natural intensities of environmental factors on cell growth // Synergy. 2018. V. 6, № 1. P. 1–8.
13. Pershagen F., Akerblom G., Axelson O. et al. Residential radon exposure and lung cancer in Sweden // New Engl. J. Medicine. 1994. V. 330. P. 159–164.
14. Petin V.G., Kim J.K. Synergistic Interaction and Cell Responses to Environmental Factors. N.Y.: Nova Publishers, 2016. 337 p.

References

1. Arskij Ju.M., Danilov–Daniljan V.I., Zalihanov M.I. and etc. Environmental problems: what happens, who is to blame and what to do? М : MNEPU, 1997. 330 p. [In Russian]
2. WHO. Ultraviolet radiation. Geneva, 1995.- 394 p. [In Russian]
3. Vronskij V.A. Applied Ecology. Rostov-on-Don: Phoenix, 1996. 512 s. [In Russian]

4. Danilov–Danil'jan V.I., Gorshkov V.G., Arskij Ju.M. and etc. The environment between the past and the future: the world and Russia (experience in environmental and economic analysis). М. : VINITI, 1994.134 p. [In Russian]
5. Dodina L.G. Violation of the health of the population and adaptation mechanisms under the influence of anthropogenic factors of low intensity. Abstract. Doct. diss. St. Petersburg, 1998. [In Russian]
6. Report 30 ICRU. Quantitative patterns and dosimetry in radiobiology. М. : Energoatmizdat, 1984. 104 p. [In Russian]
7. Evstratova E.S., Petin V.G. Biophysical interpretation of the dependence of synergism on the intensity of the agents used // Biophysics. 2018.Vol. 63. Issue. 6, p. 1186–1194. [In Russian]
8. Petin V.G., Zhurakovskaya G.P., Komarova L.N. Radiobiological Basis of Synergistic Interaction in Biosphere. М.: GEOS., 2012. 218 p. [In Russian]
9. Feller V. Introduction to probability theory and its applications. М. : Mir, 1967.765 p. [In Russian]
10. Shubik V.M., Kolotvin V.A., Liberman A.N. et al. The effect of combined microwave and x-ray irradiation on immunological reactivity // Hygienic assessment of factors of radiation and non-radiation nature and their combinations / Ed. A.N. Liberman. - L. : Ministry of Health of the RSFSR, 1976. - p. 42–44. [In Russian]
11. Archer V.E. Enhancement of lung cancer by cigarette smoking in uranium and other miners // Carcinogenesis.1985. V. 8, № 1. P. 23–37.
12. Evstratova E.S., Petin V.G., Zhurakovskaya G.P. Synergistic effects and their potential significance for the influence of natural intensities of environmental factors on cell growth // Synergy. 2018.V. 6, № 1. P. 1–8.
13. Pershagen F., Akerblom G., Axelson O. et al. Residential radon exposure and lung cancer in Sweden // New Engl. J. Medicine. 1994. V. 330. P. 159–164.
14. Petin V.G., Kim J.K. Synergistic Interaction and Cell Responses to Environmental Factors. N.Y.: Nova Publishers, 2016. 337 p.