

УДК: 611.36+612-092.9+616-003.96:546.815

ЦИТОХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ПОРУШЕНЬ КЛІТИННОГО МЕТАБОЛІЗМУ ПРИ ВПЛИВІ СВИНЦЮ НА ОРГАНІЗМ ЩУРІВ ТА ЇХ РОЛЬ У ПАТОГЕНЕЗІ СВИНЦЕВОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ

Луговський С.П.

ДП Український НДІ промислової медицини МОЗ, м. Кривий Ріг

Ключові слова: свинець, щури, цитохімія, клітинний метаболізм

Вступ

Результати клінічних спостережень та експериментальних досліджень, проведених в останні роки в Україні та за її межами свідчать про те, що в організмі, який підпадає під навантаження свинцю (Pb) на шляхах транспорту, розподілу, клітинного метаболізму, біотрансформації, депонування та його екскреції відбуваються молекулярні перебудови у процесах енергетичного та біосинтетичного обміну з біфуркацією у синдром переважного блокування, деструкції та дезорганізації морфо-функціональних систем з виходом у токсичні синдроми (абдомінальний, гематологічний, гепато-, нефро- і нейротоксичний та ін.) або багатоетапний комплекс адаптивно-компенсаторних змін, мобілізації резервів з реституцією біосистеми *ad integrum* або розвитком недостатності функції окремих органів та систем [1, 2, 3].

З позицій сучасної теорії патогенезу свинцевої інтоксикації зміни клітинного метаболізму при впливі Pb на організм обумовлені його ферментотоксичною і мембранотропною дією, у наслідок блокування металом функціональних білкових груп (сульфгідрильних, карбоксильних, амінних), а також властивостями Pb викликати оксидативний стрес [2, 4, 5]. В останні роки важливого значення набули питання щодо індукції Pb апоптозу, роль якого у патогенезі металотоксикозу активно обговорюється в літературі [6, 7]. При цьому необхідно відмітити, що апоптозу завжди передують зміни, які характеризують метаболічні порушення клітин. Зокрема, до ранніх чинників індукції апоп-

тозу належить флуктуація внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} , причому не тільки підвищення рівня її в цитоплазмі, скільки порушення внутрішньоклітинної компартменталізації катіона, що супроводжується дисбалансом Ca^{2+} -пулів ендоплазматичного ретикулуму та мітохондрій і локальним підвищенням рівня катіона всередині ядра [8, 9, 10, 11].

Кальцій є важливим сигнальним месенджером, внаслідок змін концентрації якого за дії різноманітних чинників регулюються важливі процеси не лише в цитоплазмі, але й у ядрі – транскрипція генів, фолдінг ДНК-полімерази, реплікація ДНК, регуляція клітинного циклу та апоптоз [8, 12]. Для здійснення регуляторних функцій необхідно, щоб кальцієвий сигнал, який спричинено агоністом передавався крізь плазматичну і ядерну мембрану [8, 13], структурна цілісність якої може порушуватись. Як відомо, модуляція клітинних функцій кальцієм здійснюється за рахунок його зв'язування з білком кальмодуліном. При цьому в структурі молекули білку існує 4 активні центри, здатних зв'язувати двохвалентні катіони. При збільшенні у внутрішньому середовищі клітини концентрації іонізованого Ca^{2+}_i на молекулах кальмодуліну відбувається насичення ним центрів зв'язування, що збільшує спорідненість до Ca^{2+} -насосу [14, 15, 16]. Внутрішньоклітинні Ca- зв'язуючі білки (кальмодулін, тропонін С і паральбумін) можуть зв'язувати не тільки Ca^{2+} , але і ряд іонів важких металів, у тому числі Pb, який виявляє властивості до іонної мімікрії [10, 17–19]. Останнє обумовлено тим, що іонний ра-

діус Pb^{2+} наближений до іонного радіусу Ca^{2+} .

Метою роботи було дослідження методами цитохімічного аналізу змін клітинного метаболізму в гепатоцитах щурів при гострому впливі Pb на організм для визначення їх ролі у механізмах розвитку свинцевої інтоксикації.

Матеріали і методи дослідження

В експерименті було використано 12 статевозрілих конвенційних рендом-бредних аутбредних самців білих щурів, масою 120–160 г. яких утримували у стандартних умовах віварію на стандартному харчовому і питному режимі, згідно рекомендацій [20]. Піддослідним щурам ($n = 6$) у черевну порожнину однократно вводили водний розчин ацетату свинцю в дозі 5,0 мг/кг, а контрольним ($n = 6$), відповідну кількість фізіологічного розчину. Всі маніпуляції з тваринами проводили згідно до вимог Європейської конвенції щодо гуманного поводження з лабораторними хребетними тваринами [21]. З експерименту тварин виводили через 5 діб шляхом декапітації після їх наркотизації гексеналом (40 мг/кг). Для цитохімічного дослідження гепатоцитів використовували мазки-відбитки печінки, які готували на предметних скельцях. Методом Нарцисова Р.П. [22] в клітинах досліджували активність сукцинатдегідрогенази (СДГ) та мітохондріальної α - гліцерофосфатдегідрогенази (α - ГФДГ(м)), які локалізовані на внутрішніх мембранах мітохондрій, а їх активність визначає характер змін енергетичного метаболізму клітин. Методом Ваштейн і Майса у модифікації Лойда в гепатоцитах досліджували активність Са- АТФази [23]. Кальцієвий метаболізм досліджували за допомогою флуоресцентного Са- зонду, хлортетрацикліну (ХТ; 20 мг/мл) [24]. Нуклеїнові кислоти, ДНК та РНК виявляли за допомогою флуоресцентного барвника, акридінового оранжевого (АО; 3,0 мг/мл), а наявність клітин з апоптичними змінами – за допомогою флуоресцентного барвника Hoechst 33342 (0,1

мкг/мл) [24]. Активність СДГ і α -ГФДГ(м) в гепатоцитах вивчали за середнім показником кількості гранул формагану, які підраховували під світловим мікроскопом «Primo Star» (Carl Zeiss), обладнаного масляним імерсійним об'єктивом ($\times 100$), не менше ніж у 30 випадково відібраних для дослідження гепатоцитів. Активність Са-АТФази вивчали за відносним показником кількості позитивно реагуючих клітин (ПРК) та середнього цитохімічного показника (СЦП), які визначали згідно рекомендацій Carlow [22]. Накопичення Ca^{2+} в цитоплазмі гепатоцитів виявляли за допомогою люмінесцентного мікроскопа ЛЮМАМ Р-8 на підставі аналізу збудженої зеленої флуоресценції халату, утвореного в клітинах при взаємодії ХТ з Ca^{2+} . РНК в гепатоцитах виявляли за наявністю в цитоплазмі і ядерцях інтенсивної флуоресценції у червоній області спектру, а ДНК – за наявністю інтенсивної флуоресценції у жовто-зеленій області спектру. При цьому брали до відома, що деструктивні зміни хроматину ядер супроводжуються відсутністю червоної флуоресценції РНК і появою флуоресценції, що заповнює увесь об'єм клітини у зеленій області спектру. Апоптичні гепатоцити виявляли за наявністю флуоресценції Hoechst 33342 у синьо-блакитній області спектру. Для контролю специфічності реакцій ставили відповідні контролю, якими були, інкубація цитологічних препаратів у середовищі без субстратів (СДГ та α - ГФДГ(м)), або у середовищі, куди додавали п-ХМБ (0,1 ммоль/мл). Останній пригнічує активність окремих гідролаз, наприклад лужної фосфатази, але не впливає на активність Са-АТФази. При дослідженні кальцієвого метаболізму контрольні препарати обробляли у 2% розчині ЕДТА, а при дослідженні РНК і ДНК їх обробляли у розчинах РНК-ази і ДНК-ази, відповідно [22, 23].

Оцінку результатів люмінесцентно-мікроскопічних досліджень (Са, ДНК та РНК) проводили напівкількісним мето-

дом. Для цього відсутність специфічної флюоресценції у клітинах визначали, як «-», низьку інтенсивність флюоресценції, як «+», помірну – «++», а високу – «+++», відповідно. Отримані результати виражали показником ПРК та середнім показником інтенсивності флюоресценції (СПФ), який розраховували після підрахунку 100 клітин у яких визначали ступінь флюоресценції. Показник СПФ розраховували за формулою:

$$СПФ = \frac{1 \cdot n_1 + 2 \cdot n_2 + 3 \cdot n_3}{100},$$

де 1, 2, і 3 – ступінь флюоресценції, а n_1 , n_2 і n_3 – кількість підрахованих клітин з відповідним ступенем флюоресценції. Для оцінки апоптозу використовували показник ПРК, який характеризував індекс апоптозу (ІА) [9].

Всі отримані результати цитохімічних досліджень обраховували методами варіаційної статистики з визначенням вірогідності за критерієм Ст'юдента.

Результати досліджень та їх обговорення

Результати проведених досліджень показали, що вплив Рb на організм щурів супроводжувався пригніченням енергетичного метаболізму гепатоцитів, який характеризувався зниженням у порівнянні з контролем активності СДГ у 2 рази ($p < 0,05$) та збільшенням активності α -ГФДГ(м) на 72% ($p < 0,05$; табл.). При цьому вираж активності ферментів в гепатоцитах піддослідних щурів завжди супроводжувались змінами

морфології утворених в ході ферментативної реакції гранул формазану. У піддослідних щурів на відміну від контрольних, де характерний тип гранул для даного виду клітин характеризувався округлою формою, не великими розмірами і високою їх щільністю гранули були представлені різнокаліберними, поліморфними цитоплазматичними включеннями, які зливались між собою і утворювали великі щільні гранулярні депозити на периферії цитоплазми та у її навколо ядерній зоні (рис. 1). Такі їх зміни у більшій мірі визначали порушення проникливості мітохондріальних мембран, де зазвичай локалізовані ферменти, а ніж свідчили про істинну активність ферментів.

Аналіз даних щодо внутрішньоклітинного метаболізму Ca^{2+} показав, що у відповідь на вплив Рb у популяції гепатоцитів помітно збільшувалась кількість клітин з інтенсивною флюоресценцією цитоплазми у зеленій області спектру (рис. 2). Кількісна оцінка за цитохімічними показниками виявила у піддослідних щурів збільшення, порівняно з контролем показника ПРК на 30% ($p < 0,05$; табл.), а показника СПФ, відповідно, на 37% ($p < 0,05$). Такі зміни

Таблиця

Цитохімічна характеристика гепатоцитів щурів при впливі свинцю

Показники	Групи		
	Контрольна (n = 6)	Дослідна (n = 6)	p
СДГ, гранул/кліт	40,00 ± 2,85 σ = 6,99	19,83 ± 1,08 σ = 2,64	< 0,001
?-ГФДГ(м), гранул/кліт	27,00 ± 2,05 σ = 5,02	46,67 ± 2,11 σ = 5,16	< 0,01
Са АТФ-аза			
ПРК, %	66,83 ± 3,38 σ = 8,28	50,66 ± 2,69 σ = 6,59	< 0,05
СЦП, од	1,21 ± 0,08 σ = 0,21	0,84 ± 0,07 σ = 0,17	< 0,05
РНК, %	74,83 ± 2,85 σ = 6,97	66,33 ± 2,23 σ = 5,47	< 0,01
ДНК, %	77,33 ± 2,35 σ = 5,75	64,50 ± 2,29 σ = 8,07	< 0,001
Апоптоз, %	8,60 ± 1,37 σ = 3,35	19,00 ± 0,89 σ = 2,19	< 0,01
Кальцій			
ПРК, %	35,83 ± 2,89 σ = 7,08	51,16 ± 2,79 σ = 6,85	< 0,05
СЦП, од	0,60 ± 0,06 σ = 0,15	0,96 ± 0,07 σ = 0,17	< 0,05

були обумовлені тим, що у піддослідних щурів у порівнянні з контролем збільшилась у 2 рази ($p < 0,05$) кількість гепатоцитів з інтенсивністю флюоресценції цитоплазми середнього ступеню (++) та на 76% ($p < 0,05$) з інтенсивністю флюоресценції високого ступеню (+++). Відомо, що інтенсивність флюоресценції ХТ в цитоплазмі може збільшуватись на декілька порядків при його зв'язуванні з Ca^{2+} та утворенні хелату, який локалізується у гідрофобному шарі плазматичної мембрани [24].

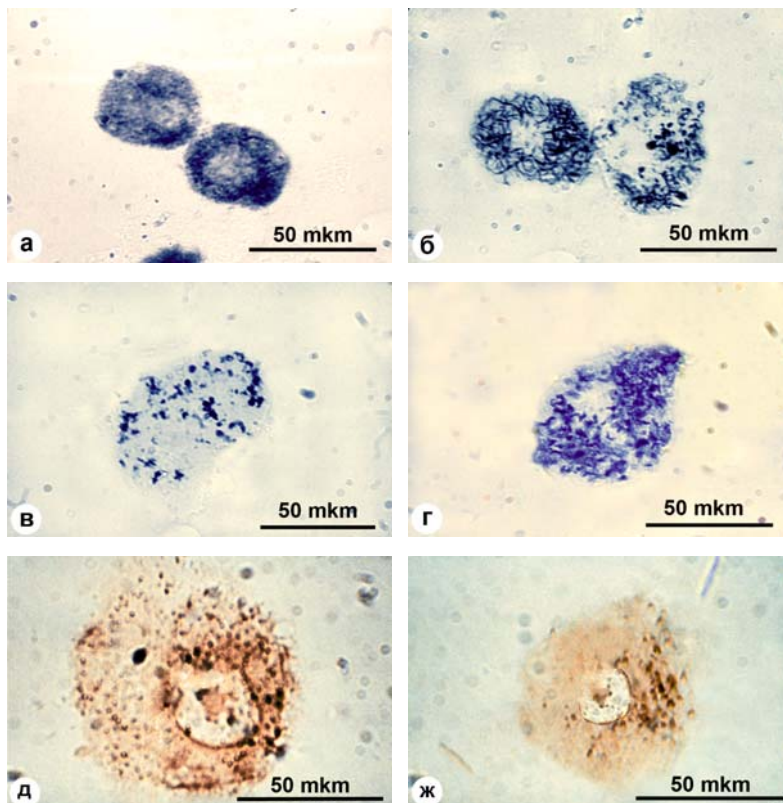


Рис. 1. Цитохімічні зміни гепатоцитів щурів при впливі Pb: а, б – активність СДГ; в, г – активність α -ГФДГ(м); д, ж – активність Ca-АТФ-ази (а, в, д – контроль, б, г, ж – вплив Pb). Метод Р.П. Нарцисова з п-НТФ (а, б, в, г) та Ваштейн і Майса у модифікації Лойда (д, ж).

При дослідженні системи активного транспорту іонів Ca^{2+} , де провідну роль відіграє кальцієвий насос – фермент Ca-АТФаза було встановлено, що у піддослідних щурів, порівняно з контролем його активність знизилась (рис. 1). За показником ПРК зниження активності ферменту було відмічено на 32% ($p < 0,05$), а за показником СЦП – на 30%, відповідно ($p < 0,05$; табл.).

Дослідження метаболізму ДНК і РНК у гепатоцитах за допомогою флюоресцентного зонду АО показало, що у піддослідних тварин у порівнянні з контролем вірогідно зменшилась кількість клітин з інтенсивною червоною флюоресценцією РНК на 11% ($p < 0,01$), а з інтенсивною зелено-жовтою флюоресценцією ДНК – на 16% ($p < 0,001$; табл.). Натомість в загальній популяції гепатоцитів були виявлені клітини, що мали рівномірно розподілену по всій площі клітин зелену флюоресценцією, або аналогічну флюоресценцію окремих

ядерних фрагментів, утворених шляхом каріорексису (рис. 2). Такі зміни характеризували деструкцію ядерного хроматину, що є характерним для апоптозу [9]. Найбільш ранніми подіями для апоптозу, за даними літератури, є зміни іонного гомеостазу в клітинах і величини внутрішньоклітинного рН (pH_i) [8, 9]. Підвищення концентрації вільних іонів Ca^{2+} в цитоплазмі характеризує початкові зміни, характерні для апоптозу [9]. В апоптичних клітинах флюоресцентний зонд Hoechst 33342 здатний легко проникати через плазматичні мембрани і зв'язуватись у клітинах з фрагментованою ДНК, що визначається за появою в клітинах характерної флюоресценції у синьо-блакитному спектрі (рис. 2).

При дослідженні апоптозу гепатоцитів після фарбування клітин Hoechst 33342 було встановлено, що у контрольних щурів відносна кількість гепатоцитів з інтенсивною блакитно-синьою

флюоресценцією коливалась у межах від 8% до 16%, а у піддослідних тварин, відповідно, від 16% до 21%. Такі зміни визначали вірогідні зміни ІА, який у піддослідних щурів на 37% перевищував контроль ($p < 0,01$: табл.). Слід відмітити, що відносно високі показники ІА гепатоцитів, які були отримані при дослідженні мазків-відбитків печінки контрольних і піддослідних щурів можуть бути пояснені з погляду на те, що втрати клітинами міжклітинних зв'язків само по собі є одним з тих факторів, що ініціює апоптоз [25].

Підсумовуючи результати проведених досліджень необхідно відмітити, що метаболічні зміни, які відбуваються у гепатоцитах щурів при гострому впливі Рв вказують на розвиток порушень іонотранспортної функції клітинних мембран в наслідок їх структурно-функціональних змін та наявність струк-

турно-функціональних перебудов мітохондрій, обумовлених змінами їх внутрішніх мембран. Останні за даними раніше проведених нами електронно-мікроскопічних досліджень [7, 26, 27] характеризуються набуханням органел, а також дезорганізацією і деструкцією крист мітохондрій з відкладенням у матриксі щільних гранулярних включень, а у вогнищах парціального некрозу органел – щільного гранулярного і фібрилярного матеріалу. При цьому, ультра-гістохімічними дослідженнями в структурі гранулярних включень у матриксі мітохондрій було виявлено накопичення Рв у комплексі з Са і фосфором [26].

Порушення іонотранспортної функції клітинних мембран та структурно-функціональні порушення мітохондрій, які є універсальними поста-

чальниками енергії в клітинах відіграють провідну роль у патогенезі свинцевої інтоксикації, бо забезпечують ініціацію механізмів його енергозалежного ланцюга.

Мітохондрії, як буферна система підтримки оптимально низької ($\approx 10^{-7}$ М) концентрації вільного Ca^{2+} в цитозолі при впливі Рв мають більш високі, ніж у нормі, концентрації цього іону в мітохондріальному матриксі [28, 29]. Постійно підвищений рівень акумуляції Ca^{2+} мітохондріями здатний викликати у них зміни, слідством яких є зниження синтезу АТФ, а відповідно, розвиток енергодефіцитного стану

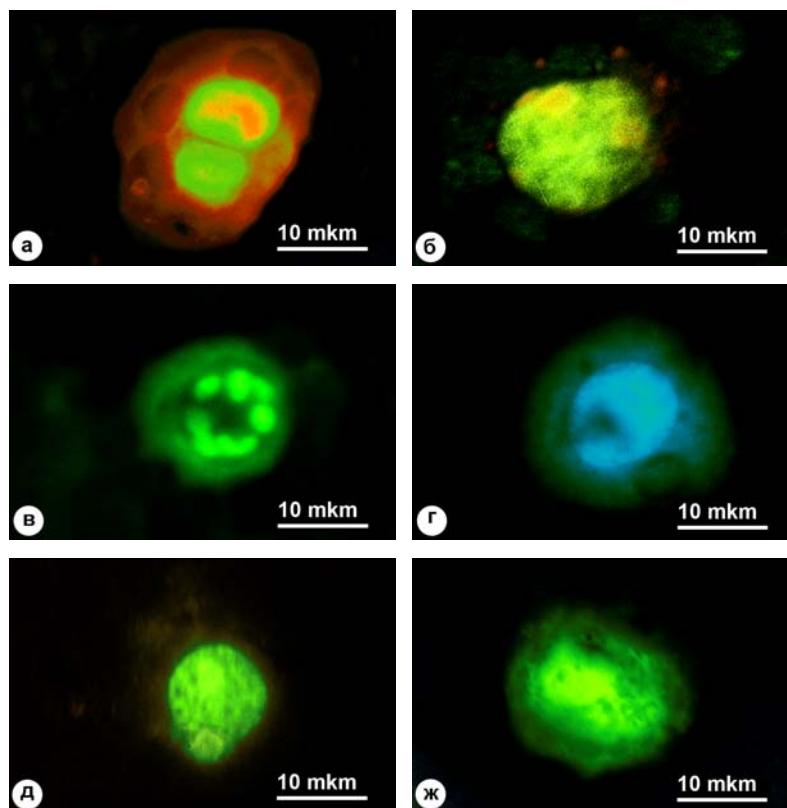


Рис. 2. Люмінесцентно-мікроскопічна характеристика гепатоцитів щурів контрольної групи (а, д) та після впливу свинцю (б, в, г, ж). Флюоресцентні зонди: а, б, в – акридіновий оранжевий; г – Hoechst 33342; д, ж – хлортетрациклін.

клітин. Відомо, що мітохондрії здатні виступати кінцевим ланцюгом сигнальної системи клітин, відповідь яких на зовнішні стимули, гормони, нейромедіатори, міжклітинні взаємодії, опосередковується через осциляції цитозольного Ca ($[Ca^{2+}]_c$), які передаються у мітохондріальний матрикс у вигляді тимчасового підвищення концентрації іону ($[Ca^{2+}]_m$). Останній регулює активність ряду ферментів ЦТК, забезпечуючи таким чином зв'язок механізму утворення АТФ в мітохондріях з енергетичними потребами конкретного фізіологічного стану клітин [28, 29].

Відомо, що у фізіологічних умовах вхід Ca^{2+} в мітохондрію викликає викачування з неї протонів, підвищення рН матриксу і відкриття у внутрішній мембрані спеціальних МРТ- каналів, або пор (mitochondrial permeability transition pore). Останнє викликає падіння протонного градієнту мітохондрій, зниження мембранного потенціалу, вихід Ca^{2+} із мітохондрій через МРТ- канал і закислення матриксу. Дихальний ланцюг відновлює протонний градієнт внутрішньої мембрани, що дає можливість для повторного здійснення аналогічного циклу. Таким чином, МРТ- канали забезпечують стимульований кальцієм вихід Ca^{2+} з мітохондрій, по суті близький за механізмом регуляції виходу Ca^{2+} із цитоплазматичного ретикулюму клітин при активації рיאнодінових рецепторів, CICR (Ca^{2+} Induced Ca^{2+} Release) [29, 30]. Конкурентна взаємодія Pb^{2+} з Ca^{2+} імовірно призводить до різкого збільшення цих іонів у мітохондріальному матриксі, що, відповідно, ініціює процеси, направлені на їх елімінацію з органел, яке може здійснюватись шляхом зміни режиму роботи МРТ- каналів, при функціонуванні останніх в режимі їх високої провідності (high conductance mode). З цим можуть бути пов'язані осмотичні зміни органел, які характеризуються їх набуханням, що часто спостерігалось нами при проведенні електронно-мікроскопічних досліджень [26,

27] та були виявлені у вигляді вираженого поліморфізму гранул формагану при цитохімічному дослідженні активності СДГ і α - ГФДГ(м) у гепатоцитах щурів. Отже структурно-функціональні перебудови мітохондрій при впливі Pb спричинюють розвиток енергодефіциту клітин. Серед усіх факторів, які визначають такі порушення одним з провідних може бути кальцієве перевантаження мітохондрій в наслідок порушень регуляції розподілення внутрішньоклітинного Ca, обумовленого змінами іонотранспортної функції мембран [28].

Структурно-функціональним порушенням мітохондрій за даними літератури [31, 32, 33] відводиться також важлива роль у процесах ініціації апоптозу. В умовах енергодефіциту клітин (анаеробні умови) у мітохондріях здатні утворюватись активні сполуки кисню (супероксид-аніон, перекис водню, органічні перекиси і радикальні сполуки). Їх накопичення в клітинах завжди корелює з апоптозом [32]. Проникливість мітохондріальних мембран напряду залежать від внутрішньоклітинного Ca^{2+} . При цьому його роль, як месенджера у процесах взаємодії між мітохондріями і ядром клітин, що відіграє важливу роль у процесах апоптозу була доведена дослідженнями, проведеними на ізольованих мітохондріях і клітинних ядрах. Було показано, що обробка мітохондрій речовиною, яка «відкриває» у них Сапори, забезпечувала її апоптичну дію [33].

Аналогічно доведена роль Pb у порушенні процесів метаболізму ДРНП в ядрах клітин, що може бути обумовлено накопиченням металу у нуклеоплазмі і, відповідно, його впливом на структуру хроматину. Проникливість Pb^{2+} у ядро клітин може бути обумовлено його конкуренцією з Ca^{2+} на рівні порових комплексів ядерної мембрани або у перинуклеарному просторі, який згідно даних літератури є основним компонентом автономної системи регуляції внутрішньоядерної концентрації Ca^{2+} [8].

Цей ядерний компартмент, так само, як ендоплазматичний ретикулум та мітохондрії, відіграє роль одного із внутрішньоклітинних кальцієвих депо.

Нажаль, дослідження кальцієвого метаболізму в гепатоцитах, які в умовах проведеного нами експерименту знаходились у стаціонарному стані не дають змоги провести кількісну оцінку швидких змін концентрації внутрішньоклітинного Ca^{2+} на субмікромолярному рівні, а відповідно, визначити кількісні критерії для оцінки ефектів цитотоксичної дії Pb. Це визначає перспективи напрямків для подальших досліджень.

Висновки

1. Метаболічні порушення в гепатоцитах, які розвиваються при гострому впливі Pb на організм щурів за даними проведених цитохімічних досліджень характеризуються змінами енергетичного метаболізму клітин у вигляді віражу активності мітохондріальних ферментів СДГ і α -ГФДГ(м), порушенням метаболізму внутрішньоклітинного Ca^{2+} у вигляді збільшення його концентрації в клітинах при зменшенні активності Са-АТФази, а також ушкодженнями ядерного хроматину, що характеризується змінами флюоресценції ДНК і РНК в гепатоцитах та збільшенням інтенсивності апоптозу.
2. Метаболічні зміни гепатоцитів щурів при гострому впливі Pb вказують на розвиток порушень іонотранспортної функції клітинних мембран та структурно-функціональних перебудов мітохондрій, обумовлених змінами у їх внутрішніх мембранах.
3. Порушення іонотранспортної функції клітинних мембран та структурно-функціональні порушення мітохондрій, які є універсальними постачальниками енергії в клітинах відіграють провідну роль у розвитку енергодефіцитного стану клітин, що може бути одним з провідних

ланцюгів патогенезу свинцевої інтоксикації.

Література

1. Трахтенберг И. М. Тяжелые металлы во внешней среде: Современные гигиенические и токсикологические аспекты / И. М. Трахтенберг, В. С. Колесников, В. В. Луковенко. – Мн. : Наука і техника, 1994. – 285 с.
2. Общая токсикология / [под ред. Б. А. Курляндского, В. А. Филова]. – М. : Медицина, 2002. – 608 с.
3. Шафран Л. М. Металонефропатії : теорія і практика / Шафран Л. М., Гоженко А. І. // Актуальні проблеми транспортної медицини. – 2009. – № 1. – С. 19–29.
4. Трахтенберг И. М. Влияние свинца на развитие окислительного стресса / И. М. Трахтенберг, Н. А. Утко, Т. К. Короленко [и др.] // Токсикологический вестник. – 2002. – № 3. – С. 22–26.
5. Трахтенберг И. М. Свинец и окислительный стресс: экологический и производственный аспекты / И. М. Трахтенберг, Н. А. Утко, Т. К. Короленко [и др.] // Соврем. проблемы токсикологии. – 2001. – № 4. – С. 50–53.
6. Шафран Л. М. Роль апоптоза в патогенезе токсических нефропатий / Шафран Л. М. // Актуальні проблеми транспортної медицини. – 2006. – № 2. – С. 15–23.
7. Луговський С. П. Апоптоз епітелію слизової оболонки тонкої кишки щурів при свинцевій інтоксикації / С. П. Луговський // Сучасні проблеми токсикології – 2002. – № 3. – С. 50–54.
8. Матишевська О. П. Особливості регуляції концентрації Ca^{2+} в ядрі // О. П. Матишевська, С. І. Борисов, Д. М. Гребіник // Укр. біохім. журн. – 2002. – № 5. – С. 5–11.
9. Фильченков А. А. Апоптоз и рак / А. А. Фильченков, Р. С. Стойка. – К. : Морион, 1999. – 184 с.

10. Transmembrane calcium flux in Pb²⁺-exposed aplasia neurons / C. T. Tamse, K. Hammar, D. M. Porterfield [et al.] // *Biol. Bull.* – 1998. – Vol. 195. – P. 201–202.
11. Broker L. E. Cell Death Independent of Caspases / L. E. Broker, F. A. E. Kruyt, G. Giaccone // *Clin. Cancer.* – 2005 – Vol 11. – № 9. – P. 3155–3162.
12. Ткачук В. А. Мембранные рецепторы и внутриклеточный кальций / В. А. Ткачук // *Соросовский образовательный журнал.* – 2001. – Т. 7. – № 1. – С.10–15.
13. Evidence for Ca²⁺ -and ATP-sensitive peripheral channels in nuclear pore complex / V. Shahin, T. Danker, K. Enss [et al.] // *FASEB J.* – 2001. – Vol. 15. – P. 1895–1901.
14. Chattopadhyaya R. Calmodulin structure refined at 1.7 Å resolution / Chattopadhyaya R., Meador W. E., Means A. R. [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 1992. – Vol. 228. – P. 1177–1192.
15. Chou J. J. Solution structure of Ca²⁺-calmodulin reveals flexible hand-like properties of its domains / Chou J. J., Li S., Klee C. B. [et al.] // *Nat. Struct. Biol.* – 2001. – № 8. – P. 990–997
16. Vetter S. W. Novel aspects of calmodulin target recognition and activation / Vetter S. W., Leclerc E. // *Eur. J. Biochem.* – 2003. – Vol. 270. – P. 404–414.
17. Garza A. Cellular mechanisms of lead neurotoxicity / A. Garza, R. Vega, E. Soto // *Med. Sci. Monit.* – 2006. – Vol. 12. – № 3. – P. 57–65.
18. Bridges C. C. Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals [Электронный ресурс] / Bridges C. C., Zalups R. K. // *Toxicol Appl. Pharmacol.* – 2005. – Vol. 204. – № 3. – P. 274–308. – Режим доступа до журн. : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15845419?itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum&ordinalpos=2.
19. Ballatori N. Transport of toxic metals by molecular mimicry / Ballatori N. // *Environ. Health Perspect.* – 2002. – Vol. 110. – № 5. – P. 689–694.
20. Кожем'якін Ю. М. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Ю. М. Кожем'якін, О. С. Хромов, М. А. Філоненко та ін. – К.: Авіцена, 2002. – 156 с.
21. European convention for the protection of vertebrate animal used for experimental and other scientific purposes. – Council of Europe, Strasburg, 1986. -53 p.
22. Биохимические и цитохимические методы определения активности ферментов и фермент – субстратных систем различной клеточной локализации: [метод. рек. / под ред. Р. В. Меркурьевой, Г. Л. Билыча, Р. П. Нарциссова] – Йошкар-Ола, 1982. – 40 с. – (НИИ общей и коммунальной гигиены им. А. Н. Сысина АМН СССР [и др.] ; вып. 1).
23. Ллойда З. Гистохимия ферментов. Лабораторные методы / З. Ллойда, Р. Госсрау, Т. Шиблер; пер. с англ. И. Б. Бухвалова [и др.]; под ред. Н. Т. Райхлина. – М. : Мир, 1982. – 270с.
24. Карнаухов В. Н. Люминисцентный спектральный анализ клетки / В. Н. Карнаухов. – М. : Наука, 1987. – 209 с.
25. Frisch S. M. A role for Jun-N-terminal kinase in anoikosis : suppression by bcl-2 and crmA / S. M. Frisch, K. Vuori, D. Kelata [et al.] // *J. Cell Biol.* – 1996. – Vol. 134. – P. 793–799.
26. Луговской С. П. Накопление и распределение свинца в ультраструктурах гепатоцитов крыс / С. П. Луговской // *Сучасні проблеми токсикології.* – 2004. – № 1. – С.22–26.
27. Луговський С. П. Ультраструктурна характеристика епітелію проксимальних каналців нирок щурів при свинцевій інтоксикації / С. П. Луговський // *Актуальні проблеми транспортної*

- медицины – 2009. – № 4. – С. 58–69.
28. Постнов Ю.В. О роли кальциевой перегрузки митохондрий и энергетического дефицита в патогенезе первичной артериальной гипертензии / Ю. В. Постнов // *Арх. Патол.* – 2001. – № 1. – С. 3–10.
29. Постнов Ю.В. Об энергозависимом звене патогенеза хронической гипертензии / Ю. В. Постнов // *Арх. Патол.* – 2009. – № 1. – С. 3–11.
30. Full reversal of Pb⁺⁺ block of L-type Ca⁺⁺ channels requires treatment with heavy metal antidotes / J. Bernal, J. H. Lee, L. Leanne [et al.] // *J. Pharmacol. Exper. Therapeutics.* – 1997. – Vol. 282. – № 1. – P. 172–180.
31. Скулачев В. П. Явления запрограммированной смерти. Митохондрии, клетки и органы: роль активных форм кислорода / В. П. Скулачев // *Соровский образовательный журнал.* – 2001. – № 6. – С. 4–10.
32. Mignotte B. Mitochondrial and apoptosis / B. Mignotte, J. I. Vayssiere // *Eur. J. Biochem.* – 1998. – Vol. 252. – P. 1–15.
33. Zauli G. Mitochondrial control of nuclear apoptosis / G. Zauli, S. A. Susin, P. Marchetti [et al.] // *J. Exp. Med.* – 1996. – Vol. 183. – P. 1533–1544.

Резюме

ЦИТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НАРУШЕНИЙ КЛЕТОЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ СВИНЦА НА КРЫС И ИХ РОЛЬ В ПАТОГЕНЕЗЕ СВИНЦОВОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Луговской С.П.

На мазках отпечатках печени крыс, которым однократно в брюшную полость был введен раствор ацетата Pb в дозе 62,5 мг/кг в гепатоцитах методами цитохимии изучали активность СДГ, α-ГФДГ(м) и Са-АТФази, а с помощью флюоресцентных зондов, акри-

динового оранжевого, хлортетрациклина и Hoechst 33342, соответственно, метаболизм нуклеиновых кислот, внутриклеточного Са и апоптические изменения. Было показано, что нарушения клеточного метаболизма при воздействии Pb были обусловлены структурно-функциональными изменениями митохондрий и нарушениями ионнотранспортной функции клеточных мембран в возникновении которых важная роль принадлежит нарушениям метаболизма внутриклеточного Са.

Ключевые слова: свинец, крысы, цитохимия, клеточный метаболизм

Summary

CYTOCHEMICAL CHARACTERISTIC OF DISORDERS OF CELL METABOLISM IN RATS EXPOSED TO LEAD AND THEIR ROLE IN PATHOGENESIS OF LEAD INTOXICATION

Lugovskoy S.P.

The activity of LDH, α-GFDG (m) and Ca-ATPase was studied in liver smears of rats after single abdominal administration of Pb acetate solution in a dose of 62.5 mg/kg in hepatocytes using methods of cytochemistry. The metabolism of nucleic acids, intracellular Ca and apoptotic changes was studied using fluorescent probes, acridine orange, chlortetracycline and Hoechst 33342. It was shown that violations of cellular metabolism under the effect of Pb were caused by structural and functional changes in mitochondria and violations of ionic transport function of cell membranes which developed due to metabolic disturbances of intracellular calcium.

Keywords: lead, rats, cytochemistry, cell metabolism

*Впервые поступила в редакцию 18.06.2010 г.
Рекомендована к печати на заседании редакционной коллегии после рецензирования*