



МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ МИТОХОНДРИЙ ГЕПАТОЦИТОВ БЕЛЫХ КРЫС ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ СОЛЕЙ ТЯЖЁЛЫХ МЕТАЛЛОВ

Очилов Комил Рахимович.

Бухарский медицинский институт, Бухара, Узбекистан

Резюме: В свете вышеизложенного приобретает изучение механизма токсического действия того или иного ксенобиотика, а также их сочетания, что предусматривает исследование их эффектов на структурное состояние клеток различных тканей и их мембранных компонентов.

В результате масштабных реформ, осуществленных за годы независимости, в нашей стране достигнуты определенные успехи в предотвращении токсического воздействия пестицидов и солей тяжелых металлов на организм человека и животных.

Ключевые слова: фосфорорганических и хлорорганических пестицидов, морфометрических и ультраструктурных параметров печени и гепатоцитов, бутилкаптакс, дронпа и соли свинца.

Соли тяжелых металлов (СТМ) присутствуют в окружающей среде и являются причиной многих хронических заболеваний человека и животных [1]. В основе токсического действия тяжелых металлов на живой организм лежит повреждение клеток и их органелл, сопровождающееся их функциональными, либо структурно-функциональными изменениями. Среди тяжелых металлов опасными для жизни и здоровья являются кадмий, кобальт, свинец, цинк, алюминий, хром и др.

Кадмий способен оказывать мутагенный и тератогенный эффекты на организм, которые приводят к незначительным разрушениям клеточного аппарата плаценты и эмбриональных тканей на ранних этапах органогенеза [2].



Увеличение гепатосоматического индекса и наличие выраженных некротических изменений в печени, является основным проявлением влияния высоких доз кадмия [3]. В труде [4] было дано объяснение, что гепатотоксическое действие кадмия, приводит к формированию значительных изменений в биохимических показателях крови человека. В условиях хронического отравления, кадмий приносит к деструкции печени и повреждению почек, так как обладает выраженным гепатотоксическим и нефротоксическим действием [5].

Токсического действия кадмия, приводя к развитию митохондриальной дисфункции. Рост ишемических явлений, возникающих из-за повреждения эндотелиальных клеток сосудов печени, приводящих к формированию гепатоцеллюлярной травмы [6]. В экспериментальном исследовании [7], было установлено, что наибольшей чувствительностью к токсическому влиянию кадмия обладают митохондрии и эндоплазматическая сеть гепатоцитов. Хроническое воздействие ксенобиотика приводит к формированию структурных изменений в клетках печеночной ткани, что проявляется в виде набухания и изменения формы митохондрий, а также в появлении признаков их биодеградации. Токсическое действие кадмия способствует развитию тотальной гидропической дистрофии гепатоцитов, местами переходящей в баллонную дистрофию. При острой интоксикации солями кобальта обнаружено: лейкоцитоз, эритроцитоз, повышение концентрации гемоглобина в крови; при хронической: лейкопения, эритроцитоз, повышение концентрации гемоглобина. При интоксикации солями металлов выявлено разрушение мембран эритроцитов крыс [8].

В связи с вышеизложенным становится актуальным изучение конкретных механизмов влияния СТМ на энергопреобразующие функции биомембран.

Цель работы изучить влияние ионов СТМ – хлористого кобальта и хлористого кадмия на дыхание и окислительное фосфорилирование (ОФ) митохондрий печени крыс в опытах *in vitro*.



Материалы и методы

Митохондрии выделяли из печени крыс массой 150-200 г. методом дифференциального центрифугирования по Шнайдеру в среде выделения, содержащей 250 мМ сахарозы, 10 мМ трис-хлорида, 1 мМ ЭДТА, pH 7,4. Содержание белка митохондрий определяли колориметрически по биуретовому методу.

Скорость дыхания митохондрий в состояниях V_3 и V_4 измеряли при помощи полярографа ОН - 102 (Венгрия, Radelkis) с открытым платиновым электродом. Величины ДК и АДФ/О определяли по методу Чанса [5], исходя из того, что количество кислорода в 0,5 мл среды инкубации при 26° С составляет 250 нг - атом кислорода. В экспериментах использовали среду инкубации (СИ): сахароза - 125 мМ, KCl - 60 мМ, KH_2PO_4 - 2,5 мМ, сукцинат - 5 мМ, трис-HCl - 5 мМ, pH -7,4; добавки АДФ до конечной концентрации 0,2 мМ; концентрация белка Мх 3 мг/мл. В инкубационную среду вносили ротенон, для предотвращения накопления щавелевоуксусной кислоты, конкурентного ингибитора окисления сукцината.

Результаты и обсуждение

При изучении действия ионов кобальта на дыхание и ОФ митохондрий в экспериментах *in vitro* (табл.1), показано, что ионы Co^{2+} ингибируют дыхание в метаболических состояниях V_3 и V_4 . При этом снижаются показатели дыхательного контроля (ДК) и АДФ/О. Однако полное разобщение ОФ не наблюдается. Достоверное ингибирование дыхания и разобщения ОФ митохондрий отмечается и при воздействии более высоких концентраций Co^{2+} ($5 \cdot 10^{-5}\text{M}$ - 10^{-4}M).

Таблица 1. Действие ионов кобальта на дыхание и окислительное фосфорилирование митохондрий печени крыс.

Условия опыта	Скорость потребления O_2 , нг-атом О/мин. мг. белка		ДК	АДФ/О
	V_3	V_4		



Контроль	74,0±1,22	19,6±0,24	3,78	2,00±0,03
Co ²⁺ 1·10 ⁻⁵ М	65,8±1,82 P<0,02	19,0±0,31 P>0,05	3,46	1,85±0,05 P<0,05
Co ²⁺ 2·10 ⁻⁵ М	58,6±2,82 P<0,01	18,4±0,24 P<0,02	3,19	1,74±0,04 P<0,01
Co ²⁺ 5·10 ⁻⁵ М	52,4±3,55 P<0,01	16,4±0,81 P<0,02	3,16	1,70±0,08 P<0,03
Co ²⁺ 1·10 ⁻⁴ М	48,0±5,18 P<0,01	14,4±1,96 P<0,05	3,3	1,62±0,03 P<0,001

Примечание*. СИ: Сахароза - 125 мМ, КСI - 60 мМ, КН₂РO₄ - 2,5 мМ, сукцинат - 5 мМ, трис-НСI - 5 мМ, рН - 7,4; добавки АДФ до конечной концентрации 200 мкМ, концентрация белка 3 мг/мл.

Известно, что в отличие от Zn²⁺, низкие концентрации Co²⁺ не влияют на дыхательную цепь, тогда одной из причин угнетения дыхания и разобщения ОФ ионами Co²⁺, возможно, является снижение потенциала мембран в результате увеличения пассивной проницаемости для заряженных частиц мембран или изменение состояния ЦсА-чувствительной поры.

По мнению исследователей [9] ионы Co²⁺ являются активаторами цитохром с -оксидазной и ротеноннечувствительной НАДН -оксидазной системы мембран митохондрий. Этими авторами показано, что повышение активности этих ферментов зависит от концентрации CoCl₂. Ионы Co²⁺ также активируют сукцинатоксидазные системы дыхательной цепи митохондрий. Авторы делают вывод, что присутствие ионов Co²⁺ в среде приводит к значительным изменениям в цепи переноса электронов митохондрий [10,11].

С.М.Коротковым и др. [12] выявлено, что действие ионов Cd²⁺ на дыхание и ОФ митохондрий является своеобразным: сравнительно низкие концентрации стимулируют дыхание в состояниях V₃ и V₄, при этом коэффициенты ДК и АДФ/О незначительно снижаются.

В этих условиях высокие концентрации этого катиона ингибируют дыхание в обоих состояниях и приводят к полному разобщению ОФ со снятием

механизма ДК. В опытах *in vitro* нами изучено влияние Cd^{2+} на дыхание и ОФ митохондрий печени крыс (табл. 2).

ТАБЛИЦА 2. Действие ионов кадмия на дыхание и окислительное фосфорилирование митохондрий печени крыс (опыты *in vitro*)*.

Условия опыта	Скорость потребления O_2 , нг-атом О/мин.мг белка		ДК	АДФ/О
	V_3	V_4		
Контроль	$70,9 \pm 0,98$	$18,3 \pm 0,21$	3,87	$2,0 \pm 0,02$
$\text{Cd}^{2+} 5,0 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$75,8 \pm 1,13$ $P < 0,05$	$20,1 \pm 0,40$ $P < 0,02$	3,77	$1,9 \pm 0,02$ $P < 0,05$
$\text{Cd}^{2+} 1,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	$83,6 \pm 2,99$ $P < 0,01$	$22,5 \pm 0,80$ $P < 0,001$	3,72	$1,9 \pm 0,02$ $P < 0,05$
$\text{Cd}^{2+} 2,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	$23,3 \pm 3,78$ $P < 0,001$	$14,5 \pm 0,84$ $P < 0,01$	1,61	$1,3 \pm 0,20$ $P < 0,02$
$\text{Cd}^{2+} 2,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ +ДТТ400мкМ	$46,3 \pm 4,86$ $P < 0,01$	$20,7 \pm 0,21$ $P < 0,001$	2,24	$1,6 \pm 0,10$ $P < 0,02$
$\text{Cd}^{2+} 7,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	$14,0 \pm 2,92$ $P < 0,001$	$14,0 \pm 0,93$ $P < 0,01$	1,00	-

Примечание*. Среда инкубации: Сахароза - 125 мМ, КСI-60 мМ, KH_2PO_4 - 2,5 мМ, сукцинат - 5 мМ, трис-НСI-5 мМ, рН -7,4; добавки АДФ до конечной концентрации 0,2 мМ.

Ионы Cd^{2+} в сравнительно низких концентрациях увеличивали показатели V_3 и V_4 , однако при этом коэффициенты ДК и АДФ/О незначительно снизились. Добавление к суспензии митохондрий Cd^{2+} до конечной концентрации $1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ также вызывало одновременную стимуляцию дыхания в состояниях V_3 и V_4 , при этом величины ДК и АДФ/О были чуть ниже уровня контроля. Дальнейшее увеличение концентрации Cd^{2+} в среде приводило к угнетению дыхания. При увеличении концентрации Cd^{2+} до $2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ дыхание митохондрий в состоянии V_3 угнеталось на 67%. Подавление дыхания наблюдалось и в состоянии V_4 . Вследствие отмеченного угнетения уменьшалась

величина коэффициента ДК до 1,61; АДФ/О-1,3. При концентрации Cd^{2+} $7,5 \cdot 10^{-5}$ М коэффициент ДК уменьшился до 1, т.е. происходило полное разобщение ОФ со снятием механизма ДК.

В наших экспериментах дитиотреитол (ДТТ) снимает эффект Cd^{2+} на дыхание и систему ОФ (табл.2). Известно, что ДТТ защищает тиоловые группы митохондриальных мембран. Можно предположить, что эффект Cd^{2+} на функцию мембран митохондрий опосредован через тиоловые группы мембран.

Механизмы действия Cd^{2+} на дыхание и ОФ митохондрий достаточно сложны и привлекают многих исследователей. Еще в 80 годы было показано, что Cd^{2+} увеличивает проницаемость мембран митохондрий для катионов и активирует дыхание. Более высокие концентрации Cd^{2+} ингибируют дыхание в присутствии разобщителей ОФ.

Действие Cd^{2+} на функции митохондрий зависит от его концентрации. По-видимому, в присутствии высоких концентраций ингибируются активности сукцинатдегидрогеназы, цитохром С - оксидазы и др. ферментов, в результате чего подавляется дыхание.

Эффект Cd^{2+} на дыхание частично снимается ионами тяжелых металлов и классическим ингибитором транспорта Ca^{2+} в Мх - рутениевым красным [13], однако механизмы действия этих агентов окончательно не выяснены.

Необходимо отметить, что эффекты Cd^{2+} на дыхание и ОФ Мх отличается от влияния Co^{2+} . В более высоких концентрациях Co^{2+} полностью не разобщает ОФ (табл.1), в то время Cd^{2+} полностью разобщает ОФ митохондрий.

Проведенными нашими исследованиями в настоящей работе установлено, что ионы Co^{2+} и Cd^{2+} разобщают ОФ. Однако, механизмы разобщения ОФ тяжелыми металлами окончательно не установлены. К настоящему времени установлены механизмы действия разобщителей ОФ. Все механизмы и постулаты действия разобщителей ОФ полагают, что они облегчают переход протонов (H^+) или других заряженных частиц непосредственно через мембрану митохондрий.

Двигателем же процесса образования АТФ из АДФ и неорганического фосфата как раз и является градиент протонов по обе стороны мембраны Мх, не проницаемой для H^+ , поддерживаемый реакциями биологического окисления. Однако, молекулы разобщителей - протонофоров могут связать H^+ , а ионофоры какой-либо катион и переносить их через внутреннюю мембрану, в результате чего наблюдается снижение МП мембран и разобщение ОФ.

Возможно, в наших экспериментах ионы тяжелых металлов взаимодействуют с мембранами митохондрий и индуцируют пассивную их проницаемость. В результате чего наблюдается снижение мембранного потенциала и разобщение ОФ митохондрий.

Таким образом, в экспериментах *in vitro* установлено, что исследуемые нами тяжелые металлы Co^{2+} и Cd^{2+} эффективно влияют на дыхание и систему ОФ митохондрий. Ионы Co^{2+} ингибируют дыхание митохондрий в состояниях V_3 и V_4 , разобщая ОФ. Эффект Cd^{2+} на дыхание и ОФ митохондрий отличается от действия Co^{2+} и других тяжелых металлов. При этом, Cd^{2+} в низких концентрациях увеличивает дыхание митохондрий, в высоких концентрациях ингибирует его. Полученные в настоящей работе результаты расширяют традиционные представления о различных механизмах действия тяжелых металлов на биоэнергетический метаболизм клетки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hodgson E., Levi P.E. Pesticides: An important but underused model for the environmental health sciences // Environ. Health Persp. – 1996. – Vol. 104. – № 1. – P. 97-106.
2. Chen, K.L. Mercuric compounds induce pancreatic islets dysfunction and apoptosis in vivo / K.L. Chen, S.H. Liu, C.C. Su // International Journal of Molecular Sciences. — 2012. — Vol. 13. — № 10. – P.12349—12366.
3. Mazzei, V. Bioaccumulation of cadmium and lead and its effects on hepatopancreas morphology in three terrestrial isopod crustacean species / V. Mazzei, G. Longo, M.V. Brundo, F. Sinatra, C. Copat, C.G. Oliveri, M. Ferrante // Ecotoxicology and Environmental Safety. — 2014. — Vol. 30. № 110. – P. 269—279.



4. Adams, S.V. Cadmium exposure and cancer mortality in the Third National Health and Nutrition Examination Survey cohort // S.V. Adams, M.N. Passarelli, P.A. Newcomb // Occupational and Environmental Medicine. — 2012. — Vol. 69. — № 2. — P. 153—156.
5. Chen, K.L. Mercuric compounds induce pancreatic islets dysfunction and apoptosis in vivo / K.L. Chen, S.H. Liu, C.C. Su // International Journal of Molecular Sciences. — 2012. — Vol. 13. — № 10. — P.12349—12366.
6. Blum J. L. Short-term inhalation of cadmium oxide nanoparticles alters pulmonary dynamics associated with lung injury, inflammation, and repair in a mouse model / J.L. Blum, L.K. Rosenblum, G. Grunig, M.B. Beasley, J.Q. Xiong // Inhalation Toxicology. — 2014. — Vol. 26. — № 1. — P. 48—58.
7. Гутникова, А.Р. Возможность восстановления структуры печени при интоксикации солями тяжелых металлов / А.Р. Гутникова, И.М. Байбеков, Д.Д. Ашурова, Б.А. Саидханов, К.О. Махмудов // Медицина труда и промышленная экология, —2012. — № 6. — С. 32—35.
8. Сравнительное действие солей кобальта на баланс белков и жидкости в организме крыс [Текст] Г.Р. Хантурина // Современные наукоемкие технологии: Мат. межд. конф. (Египет, 2011) // Между народный журнал приклад. И фундамент. исследований.- 2011.- №5.- С. 61-62.
9. Алматов К.Т., Саидходжаев Г.М., Клемешева Л.С., Иргашев М.С. Защитное действие кобальта при инактивации сукцинатоксидазы и НАДН-оксидазы дыхательной цепи митохондрий фосфолипазой A₂ // Узб.биол.журн. — Ташкент, 1998. № 2. — С. 32-35.
10. Ибрагимова К.М., К.Т.Алматов. Действие ионов кобальта на дыхательной функции митохондрий // Наука, образование, техника. Международный научный журнал. — Министерство образования и культуры Кыргызской Республики, 2003. — № 1-2. — С. 104-109.
11. Саидходжаев Г.М., Иргашев М.С., Клемешева Л.С., Алматов К.Т. Влияние ионов кобальта на активность полиферментных систем дыхательной цепи митохондрии печени крыс // Узб. биол. журн. — 1996. № 1-2. — С. 17-20.



12. Коротков С.М., Глазунов В.В., Розенгарт Е.В., Суворов А.А., Нестеров И.П., Хованских А.Е. Влияние гидрофильного комплекса кадмия с анабазином на энергизованные митохондрии печени крысы // Доклады Академии наук России. –Россия, 1996. – Т. 346. – № 4. – С. 552-554 .
13. Коротков С.М., Скульский И.А. Изменение влияния Cd^{2+} на дыхание изолированных митохондрий печени крысы после их преинкубации с Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Mn^{2+} и рутениевым красным // Цитология. – 1996. – Т. 38. – № 4-5. – С. 500-509.