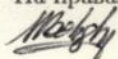


Харьковский Государственный Университет

На правах рукописи



Беанзен Гбесохеле Жюстен

**Влияние солей кобальта и ртути на липиды и
функциональную активность эритроцитов
и клеток печени.**

03.00.04. Биохимия

03.00.13. Физиология человека и животных

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Харьков - 1996



AB34.651

Робота виконана на базі кафедри біохімії і інститута біології ХГУ.

Научные руководители:

- доктор біологічних наук,
професор Калиман Павел Авксентьевич
- доктор біологічних наук,
вед. науч. сотр. Бабенко Наталия Алексеевна

Официальные оппоненты:

- доктор біологічних наук,
доцент Древаль Владислав Иванович
- доктор біологічних наук,
професор Гладкова Алла Ивановна

Ведущая организация: — Харьковский государственный медицинский университет

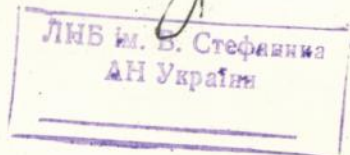
Защита диссертации состоится "24" мая 1996 г. в "15" часов на заседании специализированного Ученого совета К 02.02.16 Харьковского государственного университета (310077, г.Харьков, пл. Свободы, 4, ауд. 3-15).

С диссертацией можно ознакомиться в центральной научной библиотеке Харьковского государственного университета.

Автореферат разослан "24" апреля 1996 г.

Ученый секретарь
специализированного Ученого совета,
кандидат біологічних наук

А.В.Наглов



Общая характеристика работы

Актуальность проблемы. Одной из важных проблем биологии и медицины является выяснение последствий действия на организмы загрязнения окружающей среды. Среди загрязнителей окружающей среды соли тяжелых металлов и их производные представляют собой значительную группу химических веществ широко используемых в промышленности, науке и технике [Боркрис Дж.О.М., 1982; Иванова Л.А.; Нижарадзе М.Я., 1984; Трахтенберг И.М., Иванова, 1984; Ермоченко А.Б., 1988]. Ртуть, по своей природе относится к токсическим веществам, в то время как кобальт, являющийся эссенциальным микроэлементом, участвует во многих процессах жизнедеятельности организма. Однако в дозах, превышающих физиологический уровень, кобальт также проявляет токсическое действие [Бех К.И., 1974; Ельфимова Е.В., Гусев М.И., Попов Л.Н., 1981].

Попадая в организм с пищей, водой, воздухом или через кожные покровы, тяжелые металлы вызывают развитие ряда заболеваний, получивших название "микроэлементозы" [Авцын А.П., Жаворонков А.А., Риж М.А., Строчкова Л.С., 1991]. Тяжелые металлы обладают широким спектром действия, изменяя состояние мембран и влияя на активность ферментов. Установлено, что введение кобальта животным сопровождается изменением активности ключевых ферментов метаболизма гема и содержания микросомальных цитохромов в печени крыс [Калиман П.А., Падалко В.И., 1981; Калиман П.А., Беловещкая И.В., 1986]. Предполагают, что в основе токсического их действия лежит влияние тяжелых металлов на мембранные структуры клетки, которые становятся доступными для них в связи с их проникновением в клетку [Трахтенберг И.М., Иванова А.А., 1984]. Однако, механизмы токсического действия солей кобальта и ртути на организм человека и животных изучены крайне недостаточно [Авцын А.М., Жаворонков А.А., Риж М.А., Строчкова Л.С., 1991; Ларский Э.Г., 1990]. Практически отсутствуют сведения о клеточных и молекулярных механизмах формирования метаболического ответа и защитных реакций при поступлении в организм солей тяжелых металлов и избыточных концентраций эссенциальных микроэлементов [Троицкий Г.В., 1989]. В формирование ответной реакции организма на введение солей тяжелых металлов могут включиться регуляторные системы как на организменном (нейрогуморальная система), так и на клеточно-молекулярном уровнях.

Учитывая тот факт, что многие тяжелые металлы и металлы с переменной валентностью активируют перекисное окисление липидов [Sunderman

F.W.Jr., 1986], которое сопровождается изменением липидного состава клеток, представляет интерес изучить липидный спектр и активность липидзависимых ферментов клеточных мембран, таких как 5'-мононуклеотидазы [Рожковский Я.В., Кресюн В.И., 1991], Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы [Зварич Е.И., 1991; Pikula S., Epstein L. et al, 1994], Mg^{2+} -АТФазы [Финдлен Дж., Эванз У., 1990; Saermark. N., Flint H., Evans W.H., 1985] при различном времени экспозиции солей тяжелых металлов.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы явилось изучение действия хлорида кобальта и хлорида ртути на липидный состав, а также структурную целостность и функциональную активность мембран клеток печени и эритроцитов.

В работе изучено:

- 1- Влияние хлорида кобальта и ртути на гемолиз эритроцитов, их липидный состав и активность Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы и Mg^{2+} -АТФазы этих клеток в условиях *in vivo* (через 30 мин, 2ч и 14 ч после введения соли животному).
- 2- Влияние хлорида кобальта и ртути на липидный состав и активность 5'-мононуклеотидазы, Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы и Mg^{2+} -АТФазы в гомогенате печени крыс в условиях *in vivo* (в те же сроки).
- 3- Влияние хлорида кобальта или ртути на липидный состав и активность 5'-мононуклеотидазы, Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы и Mg^{2+} -АТФазы изолированных гепатоцитов крыс в условиях *in vitro*.
- 4- Влияние хлорида кобальта или ртути на липидный состав и активность 5'-мононуклеотидазы, Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы и Mg^{2+} -АТФазы изолированных клеток печени крыс, которым вводили тироксин.

Научная новизна. Впервые показано, что введение животным сублетальных доз эссенциального микроэлемента – кобальта или токсического – ртути сопровождается увеличением содержания липидов и изменением функциональной активности гепатоцитов.

Было установлено, что увеличение содержания липидов и изменение функциональной активности мембран эритроцитов после введения животным хлорида кобальта или ртути сопровождаются лизисом (повышением степени гемолиза) эритроцитов.

С увеличением времени с момента введения солей тяжелых металлов в организм усиливается их действие на липиды и функциональную активность клеток.

Впервые установлены ранние, проявляющиеся на первых минутах воздействия, эффекты солей тяжелых металлов на липиды и функциональную активность клеток печени в условиях *in vitro*.

Установлено, что изменение тиреоидного статуса подопытных животных в результате введения им экзогенного тироксина изменяет ответ клеток на действие токсического элемента – ртути.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Введение сублетальных доз хлорида кобальта и хлорида ртути изменяет содержание фосфолипидов и нейтральных липидов и функциональную активность плазматической мембраны и ускоряет лизис эритроцитов.

2. Введение хлорида кобальта и хлорида ртути влияет на липидный состав и функциональную активность клеток печени.

3. Инкубация изолированных гепатоцитов с солями кобальта и ртути повышает уровень липидов и активирует функциональную активность клеток.

4. Тироксин нивелирует действие хлорида ртути на некоторые фракции липидов и активирующее действие последнего на активность 5'-мононуклеотидазы и Mg^{2+} -АТФазы.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Полученные данные в настоящей работе углубляют понятие о воздействии сублетальных доз токсического элемента – ртути и эссенциального – кобальта на клетки животных в целом. Эти данные могут являться основой для дальнейшего выявления механизмов действия солей ртути и кобальта на молекулярном или клеточном уровне.

Практическая значимость работы состоит в необходимости учитывать кратковременное влияние повреждающих агентов загрязнителей окружающей среды на клетки, ткани и, возможно, на организм в целом.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы докладывались на заседаниях кафедры биохимии и на научной конференции молодых ученых-биологов ХГУ, Харьков, 1995 и 1996 гг.

Публикация материалов. По материалам диссертации опубликованы 5 научных работ.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 149 страницах машинописного текста, содержит 30 таблиц, 23 рисунка и состоит из

ведения, обзора литературы, описания методов исследования, изложения полученных результатов, их обсуждения, заключения, выводов, списка использованной литературы и приложения.

Список литературы включает 263 источника, из них 144 на иностранных языках.

Материалы и методы исследования

При выполнении настоящей работы использовали белых крыс линии Вистар, самцов 3-х месячного возраста. Объектом исследования служили гомогенат печени, эритроциты и изолированные гепатоциты крыс. Животные были разделены на группы в зависимости от задачи эксперимента:

1. Животные, которым вводили растворенные в физиологическом растворе $CoCl_2(H_2O)_6$ или $HgCl_2$ (внутрибрюшинно) из расчета 3 мг и 0,7 мг соответственно на 100 г массы тела животных [Калиман П.А., Беловешкая И.В., 1986; Иванова Л.А., 1982; Arizono K. et al, 1991]. Животных декапитировали через 30 мин, 2 ч и 14 часов после введения соли и получали эритроциты и гомогенат печени.

2. Контрольные животные, которым вводили (внутрибрюшинно) физиологический раствор (0,9% $NaCl$) в объеме, соответствующем объему вводимого раствора соли. Животных декапитировали через 30 мин, 2 и 14 часов после введения физиологического раствора и получали эритроциты и гомогенат печени.

3. Интактные животные, из печени которых выделяли гепатоциты.

4. Животные, которым вводили однократно (внутрибрюшинно) L-тироксин в дозе 200 мг/100 г массы тела [Бабенко Н.А., 1991] за 48 часов до забоя. Затем из печени этих животных выделяли гепатоциты.

— Тени эритроцитов и гомогенат печени использовали для определения липидного состава и активности ферментов, эритроциты — для определения спонтанного гемолиза.

— При изучении влияния солей на липидный состав и активность ферментов изолированных гепатоцитов, клетки инкубировали в течение 2, 5 и 10 мин при 37°C в среде, содержащей 250 мМ сахарозы, 5 мМ KCl , 0,4 мМ KH_2PO_4 , 0,4 мМ Na_2HPO_4 , 0,8 мМ $MgSO_4$, 1,2 мМ $CaCl_2$, 10 мМ трис- HCl , pH 7,4 и 1% бычьего сывороточного альбумина и 0,1% $CoCl_2$ или $HgCl_2$.

В основе метода выделения гепатоцитов крыс лежит метод Канаевой и соавт. [Канаева И.П. и др., 1975]. Гомогенат клеток печени готовили в среде

выделения, содержащей 0,14 М KCl и 0,025 М $NaOH$. Выделение эритроцитов и получение их теней проводили как описано в работах Болдырева и соавторов и Нигли и соавт. [Болдырев А.А. и др., 1983; Niggli V, Penniston J.T., Sarafoli E., 1979], а спонтанный гемолиз – в работе Строева и соавт. [Строев Е.А. и др., 1986]: Экстракция липидов из ткани печени и из клеток – по методу Блайя и Дайера [Bligh E.G., Dyer W.J., 1959]. Разделение липидов на фракции производили методом тонкослойной хроматографии на коммерческих пластинах “Silufol U.V.254” (Sklarny Kavalier, Czechoslovakia). Для разделения фосфолипидов использовали систему растворителей: хлороформ – метанол – уксусная кислота – вода (25:15:4:2 по объему), а для общих липидов – систему растворителей: гексан – диэтиловый эфир – уксусная кислота (36,5:12,5:1 по объему) [Финдлей Дж., Эванс У., 1990]. Количество липидов определяли по методу Марча и Вейнштейна [March J.B., Weinstein D.B., 1966]. Активность АТФаз определяли как описано в работах Древаля и соавт., Клаудио и соавторов [Древаль В.И. и др., 1990; Claudio J. Herscher et al., 1994], а активность 5'-мононуклеотидазы – как описано в работах Леско и соавт., Рожковского и Кресюна [Lesko L. et al., 1973; Рожковский Я.В., Кресюн В.И., 1991]. Содержание белка в гомогенатах печени определяли по Миллеру [Miller G.L., 1959], а результаты статистически обрабатывали по методу Стьюдента-Фишера [Бейли, 1964; Закс Л., 1976]

Результаты экспериментальных исследований.

Влияние солей кобальта и ртути на липиды эритроцитов и функциональную активность мембран клеток.

Установлено, что уже через 30 мин после введения крысам хлорида кобальта, происходит снижение содержания в эритроцитарных мембранах уровня ФИ+ФС с $5,02 \pm 0,31$ нмоль/мг белка в контроле до $3,69 \pm 0,40$ нмоль/мг белка в опытных пробах и СФМ+ЛФХ с $5,77 \pm 1,21$ нмоль/мг белка в контроле до $1,87 \pm 0,26$ нмоль/мг белка в опыте.

Под действием хлорида ртути происходит снижение в клетках содержания ФХ с $12,56 \pm 0,29$ нмоль/мг белка в контроле до $10,59 \pm 0,75$ нмоль/мг белка в клетках опытных животных. Таким образом, видно, что введение животным сублетальных доз как токсического элемента – ртути, так и эссенциального – кобальта вызывает быструю перестройку липидного состава мембранных структур эритроцитов. В то же время эффект этих элементов на липиды эритроцитов различен. Наблюдаемые при этом быстрые изменения уровня

отдельных липидов, по-видимому, являются результатом активации соответствующих липолитических ферментов.

Через 2 часа после воздействия хлорида кобальта на организм животных уровень изученных классов липидов не меняется по сравнению с контролем; в то время как за этот же срок воздействия хлорида ртути наблюдалось увеличение содержания СФМ+ЛФХ с $5,37 \pm 0,39$ до $7,29 \pm 0,23$ нмоль/мг белка и ХС с $4,99 \pm 0,23$ до $7,81 \pm 0,79$ нмоль/мг белка по сравнению с контролем. С увеличением времени после инъекции соли ртути до 14 часов этот эффект усиливается и, кроме того, наблюдаются глубокие изменения уровня таких липидов, как ФЭА и СЖК, содержание которых при этом увеличивается по сравнению с контролем в среднем на 49,8 и на 37,4% соответственно. Через 14 часов после инъекции хлорида кобальта отмечено существенное увеличение содержания в мембранах практически всех изученных липидов. Исключения составляют ФИ+ФС и СЖК – уровень которых в эритроцитах опытных животных сходен с их содержанием в эритроцитах контрольных крыс.

По-видимому, в различные сроки с момента введения солей тяжелых металлов включаются различные механизмы, приводящие к изменению содержания липидов определенных классов в мембранах клеток. Можно предположить, что если в первые 30 минут эксперимента наблюдается непосредственное воздействие ионов металлов на соответствующие фосфолипазы, то в более поздние периоды происходит нарушение нормального соотношения процессов деградации липидов и их ресинтеза за счет либо подавления гидролиза липидов, либо за счет усиления их синтеза.

Обнаруженное в настоящей работе нарушение нормального содержания в мембранах уровня фосфолипидов на фоне увеличения содержания ХС и СЖК может способствовать нарушению целостности мембран эритроцитов. Так, в настоящей работе установлено, что изменение степени гемолиза проявляется через два часа после введения хлорида ртути крысам и усиливается после 14 часов после воздействия этого агента на организм животного. После введения хлорида кобальта изменение степени гемолиза отмечалось только через 14 часов.

Было изучено влияние хлорида кобальта и хлорида ртути на активность Ca^{2+} -АТФазы. Через 30 минут после внутрибрюшинного введения $CoCl_2$ или $HgCl_2$ крысам активность этого фермента не изменилась. Через 2 часа после введения $CoCl_2$ активность фермента повысилась, но в течение последующих 12-ти часов активность Ca^{2+} -АТФазы возвращалась к исходному уров-

ню. После введения хлорида ртути активность этого фермента повысилась только через 14 часов.

Возможно, что повышение активности Ca^{2+} -АТФазы через 2 часа после введения хлорида кобальта является результатом прямого действия ионов Co^{2+} на ионные каналы мембран, обеспечивающие транспорт ионов Ca^{2+} внутри эритроцитов. По мере элиминации ионов Co^{2+} из кровотока, их взаимодействие на ионные каналы мембран эритроцитов прекращается и активность фермента возвращается к исходному уровню через 14 часов после введения $CoCl_2$. Что касается действия хлорида ртути, то повышение активности фермента через 14 часов после введения этого агента, по-видимому, связано с неспецифической стресс-реакцией, развивающейся в ответ на введение токсического микроэлемента, действия ионов которого проявляется только в связанном виде с SH- группами белков [Ершов Ю.А., Плетенева Т.В., 1989]. Таким образом, можно предположить, что наблюдаемые действия $CoCl_2$ и $HgCl_2$ на активность Ca^{2+} - АТФазы мембран эритроцитов опосредуются разными механизмами.

Активность Mg^{2+} - АТФазы мембран эритроцитов повысилась через 14 часов после введения животным солей тяжелых металлов. Эти результаты говорят в пользу того, что действия ионов Co^{2+} и Hg^{2+} на активность Mg^{2+} -АТФазы имеют сходный характер. Известно, что этот фермент является липидзависимым и среди липидов, входящих в состав липопротендных комплексов этого фермента особое место занимает СФМ, который во многом определяет его активность [Финдлен Дж., Эванс У., 1990].

Сопоставление результатов анализа липидного спектра мембран эритроцитов с изменением активности фермента через 14 часов после воздействия солей тяжелых металлов свидетельствует об определенной взаимосвязи между изменением содержания СФМ+ЛФХ и повышением активности Mg^{2+} -АТФазы.

Таким образом, из выше изложенного видно, что мембраны эритроцитов под влиянием сублетальных доз как соли кобальта, так и ртути становятся менее устойчивыми, нарушается их структура и изменяется функциональная активность плазматических мембран этих клеток.

Влияние солей кобальта и ртути на липиды печени и на функциональную активность клеток (in vivo)

Установлено, что введение животным хлорида кобальта практически не влияет на содержание нейтральных липидов, однако существенно увеличивает уровень общих фосфолипидов, измеряемый через 30 мин и 14 часов после

воздействия. В то же время, при введении животным хлорида ртути первые изменения в содержании общих липидов наблюдаются только через 2 часа. С увеличением времени с момента ингаляции хлорида ртути до 14 часов этот стимулирующий эффект усиливается.

Анализ различных фракций липидов показывает, что через 30 мин с момента введения соли кобальта содержание ФХ повышалось с $13,96 \pm 1,24$ до $24,59 \pm 3,16$ нмоль/мг белка и ФЭА – с $9,94 \pm 0,63$ до $12,45 \pm 0,9$ нмоль/мг белка. Через 2 часа уровень липидов остается не измененным под влиянием $CoCl_2$, в то время как под действием $HgCl_2$ повышается содержание ФЭА, ФХ, СФМ+ЛФХ и ХС. Через 14 часов после введения $CoCl_2$ достоверно повышалось содержание ФЭА, ФХ, СФМ+ЛФХ и ХС на 58; 28,6; 81,9; и 23,4% соответственно. Введение $HgCl_2$ подопытным животным сопровождалось повышением содержания практически всех изученных фракций липидов. Исключение составляет фракция ФИ+ФС, уровень которой остается неизменной и через 14 час после экспериментального воздействия.

Данные о влиянии хлорида кобальта и ртути на активность 5'-моонуклеотидазы, Ca^{2+} -АТФазы и Mg^{2+} -АТФазы представлены на рис.1 (а,б).

Учитывая литературные данные о влиянии СФМ и ХС на активность 5'-моонуклеотидазы (Рожковский Я.В., Кресюн В.И., 1991), а СФМ на активность Mg^{2+} -АТФазы (Финдлен Дж., Эванз У., 1990), а также результаты настоящего исследования, можно предположить, что изменения липидного спектра мембран клеток печени под действием сублетальных доз солей кобальта и ртути – важная причина увеличения активности данных ферментов в настоящих экспериментах.

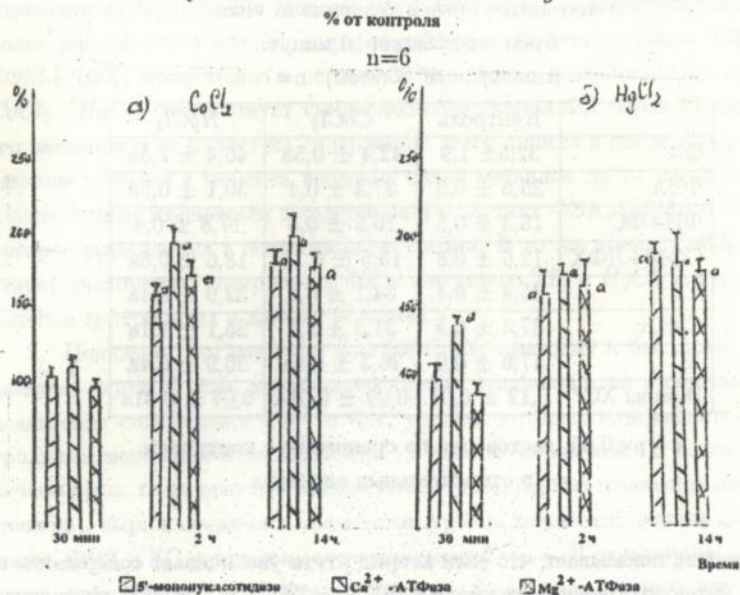
Влияние солей кобальта и ртути на липиды и функциональную активность клеток печени в условиях *in vitro*

В течение 2-х первых мин инкубации изолированных гепатоцитов в присутствии $HgCl_2$ наблюдалось повышение содержания ФХ с $37,3 \pm 0,4$ в контроле до $4,08 \pm 1,1$ нмоль/ $3 \cdot 10^6$ клеток в опытных пробах и ХС с $18,8 \pm 0,6$ до $21,8 \pm 0,6$ нмоль/ $3 \cdot 10^6$ клеток.

Увеличение времени инкубации клеток с солями тяжелых металлов до 10 мин приводило к более глубоким изменениям содержания в них липидов различных классов (Табл.1).

При этом активность 5'-моонуклеотидазы повышалась только через 10 мин инкубации клеток с солями кобальта и ртути, что, по-видимому, является результатом увеличения содержания в мембранах гепатоцитов СФМ, кото-

Рис.1. Влияние хлорида кобальта и хлорида ртути на активность 5'-мононуклеотидазы, Ca^{2+} -АТФазы и Mg^{2+} -АТФазы



а - $p < 0.05$, достоверно по сравнению с контролем.

рий является компонентом липопротеидного комплекса 5'-мононуклеотидазы плазматической мембраны клеток печени.

Добавление хлорида кобальта или хлорида ртути в среду инкубации не вызывает изменения активности Ca^{2+} -АТФазы. В то же время хлорид ртути увеличивает активности Mg^{2+} -АТФазы через 10 мин с момента его введения в инкубационную среду.

Установлено, что под действием тироксина происходит повышение уровня в клетках практически всех изученных фракций липидов по сравнению с контролем. Исключение составляют ФП+ФС, содержание которых не меняется при воздействии тиреоидного гормона. Анализ липидных спектров клеток интактных животных и животных, которым предварительно вводили экзоген-

Влияние хлорида кобальта и хлорида ртути на липиды гепатоцитов крыс в условиях *in vitro*.

Время инкубации 10 минут.

(1моль/3 · 10⁶ клеток). n=7

	Контроль	<i>CoCl</i> ₂	<i>HgCl</i> ₂
ФХ	32,5 ± 1,9	42,4 ± 0,5a	46,4 ± 1,5a
ФЭА	25,6 ± 0,9	27,3 ± 0,4	30,1 ± 0,5a
ФИ+ФС	15,3 ± 0,5	16,5 ± 0,3	17,8 ± 0,6
СФМ+ЛФХ	12,6 ± 0,8	15,5 ± 0,7a	18,6 ± 0,6a
ТГ	35,4 ± 0,4	34,1 ± 0,4	32,9 ± 0,4a
СЖК	27,4 ± 0,5	31,3 ± 2,1	35,1 ± 1,1a
ХС	17,6 ± 0,6	26,3 ± 0,9a	30,9 ± 0,4a
Эфиры ХС*	0,12 ± 0,01	0,09 ± 0,01a	0,07 ± 0,01a

a - $p < 0,05$, достоверно по сравнению с контролем.

* - в относительных единицах

ный тироксин, показывает, что если хлорид ртути увеличивает содержание в клетках интактных животных уровень ФХ на 42%, а ХС на 75% по сравнению с контролем, то в клетках животных, подвергнутых воздействию тироксина на 28% и 28% соответственно. Следует отметить так же, что тироксин полностью нивелирует действие хлорида ртути на содержание в гепатоцитах ФЭА, ТГ и СЖК и активность 5'мононуклеотидазы и Mg^{2+} -АТФазы. Таким образом, из проведенных исследований видно, что тироксин не изменяет эффект эссенциального элемента - кобальта на липиды гепатоцитов и функциональную активность плазматических мембран, в то время как отменяет или подавляет действие токсического элемента - ртути.

Отсутствие синергизма в действии хлорида ртути и тироксина на содержание липидов в клетках печени свидетельствует о том, что ионы металла в гепатоцитах интактных животных увеличивают уровень липидов не путем увеличения их синтеза *de novo*, а скорее всего в ходе нарушения соотношения между процессами синтеза и распада липидов за счет подавления активности липолитических ферментов.

В работе приняты следующие сокращения: ФХ - фосфатидилхолин, ФЭА - фосфатидилэтаноамин, ФИ+ФС - фосфатидинозит + фосфатидилсерин, СФМ + ЛФХ - сфингомиелин - лизофосфатидилхолин, ТГ - триацилглицерол, СЖК - свободные жирные кислоты, ХС - холестерин.

Выводы.

1. Установлено, что введение животным сублетальных доз солей кобальта и ртути сопровождается глубоким, но в различной степени выраженными изменениями содержания липидов изучаемых классов в эритроцитах. Наиболее ранний ответ клетки, выражающийся в снижении уровня ФИ+ФС и СФМ+ЛФХ, происходит в первые 30 мин после воздействия на организм $CoCl_2$. $HgCl_2$ способствует снижению содержания ФХ через 30 мин после его введения и не влияет на содержание этого липида в последующем. Увеличение времени с момента введения солей металлов до 14 часов приводит к однотипным изменениям в содержании в клетках ФЭА, СФМ+ЛФХ и ХС, которое выражается в повышении их уровня. В то же время, $CoCl_2$ способствует увеличению содержания ФХ и снижению ТГ, а $HgCl_2$ – увеличению СЖК в эритроцитах в данных условиях.

2. Показано, что введение крысам $CoCl_2$ приводит к быстрому, наблюдаемому через 30 мин, увеличению уровня фосфолипидов в печени за счет повышения содержания ФЭА и ФХ, уровень которых возвращается к контрольным значениям в последующие 1,5 часа эксперимента. В то же время в печени крыс, подвергнутых воздействию $HgCl_2$, первые изменения липидного спектра, выражающиеся в увеличении уровня холинсодержащих фосфолипидов, ФЭА и ХС наблюдаются только через 2 часа. В дальнейшем (через 12 часов) наблюдаемый эффект усиливается и кроме того, происходит увеличение содержания СЖК и ТГ в клетках печени.

В целом, через 14 часов после введения солей ртути и кобальта наблюдаются идентичные изменения липидного спектра печени. Исключение составляют ТГ и СЖК, содержание которых в печени животных, обработанных $CoCl_2$ не отличается от такового контрольных крыс.

3. Установлено, что соли кобальта и ртути вызывают однотипные изменения активности Mg^{2+} -АТФазы в эритроцитах и клетках печени. Однако, активирующий эффект солей тяжелых металлов на фермент эритроцитарных мембран наблюдается только через 14 часов, в то время, как в печени – через 2 часа после введения препаратов. Иным образом влияют соли тяжелых металлов на активность Ca^{2+} -АТФазы в изученных типах клеток. Так, если активирующее действие $CoCl_2$ на фермент эритроцитарных мембран наблюдается только через 2 часа, после инъекции препарата подопытным животным, то в печени через 2 часа и через 14 часов после экспериментального воздействия.

Наиболее ранний, активирующий эффект, наблюдаемый через 30 мин после воздействия на организм $HgCl_2$, выявлен в печени. При увеличении времени с момента его введения крысам активирующее действие соли металла на Ca^{2+} -АТФазу печени усиливается.

В то время как эритроцитарных мембранах эффект активации наблюдается только через 14 часов после экспериментального воздействия.

4. Выявлены однотипные изменения активности 5'-мононуклеотидазы в клетках печени животных, обработанных $CoCl_2$ и $HgCl_2$.

Активность фермента существенным образом повышается в гомогенатах печени подопытных животных по сравнению с контрольными крысами через 30 мин и этот эффект сохраняется в последующие 13,5 часа.

5. Установлено, что инкубация выделенных гепатоцитов с $CoCl_2$ и $HgCl_2$ в течение 0 - 10 минут приводит к однонаправленным, однако более выраженным в случае $HgCl_2$, изменениям активности 5'-мононуклеотидазы и липидного спектра клеток. Увеличение содержания холинсодержащих фосфолипидов совпадает (в экспериментах с $CoCl_2$) или предшествует (в опытах с $HgCl_2$) активации 5'-мононуклеотидазы и Mg^{2+} -АТФазы. Наиболее глубокие и быстро наступающие изменения в содержании изученных фосфолипидов и нейтральных липидов наблюдаются при инкубации гепатоцитов с $HgCl_2$.

6. Введение тироксина подопытным животным сопровождается повышением в гепатоцитах содержания фосфолипидов, ТГ, СЖК, ХС и активности 5'-мононуклеотидазы. В то же время одиночная инъекция гормона не изменяет активность Ca^{2+} и Mg^{2+} -АТФаз клеток печени.

7. Изменение тиреоидного статуса подопытных животных в эксперименте изменяет ответ гепатоцитов на воздействие солей тяжелых металлов в условиях *in vitro*. В данных условиях активирующее действие $HgCl_2$ на 5'-мононуклеотидазу и Mg^{2+} -АТФазу клеток нивелируется. Иным образом, чем в интактных клетках под действием $HgCl_2$ изменяется липидный спектр гепатоцитов животных подвергнутых действию экзогенного T_4 . При этом наиболее быстро, чем в клетках интактных животных происходит под влиянием $HgCl_2$ накопление в клетках СФМ+ЛФХ. При сочетанном действии T_4 и $HgCl_2$ полностью отсутствует эффект последнего на такие липиды гепатоцитов как ФЭА, ТГ и СЖК.

8. Таким образом, в настоящей работе впервые установлено влияние солей ртути и кобальта на липиды и функциональную активность печени, отдельных ее клеток и эритроцитов животных различного гормонального статуса.

Показана также взаимосвязь между изменением под действием сублетальной дозы солей кобальта и ртути липидного спектра изученных клеток и изменением активности ряда ферментов их мембран. При этом впервые установлено глубокое воздействие токсического элемента (ртути) на функциональную активность клеток печени в опытах *in vitro*.

Список опубликованных работ по теме диссертации

1. Беанзен Г.Ж., Бабенко Н.А., Калиман П.А. Механизм действия солей ртути и кобальта на функциональное состояние клеток.// "Адаптация организма при стрессовых ситуациях" III международный симпозиум врачей. 11-14 окт. 1995г. Геленджик. Тез. докл. Анапа. 1995. с.42-43.

2. Беанзен Г.Ж. Влияние солей кобальта и ртути на липиды и функциональную активность мембран эритроцитов.// Там же. с.43.

3. Беанзен Г.Ж. Влияние солей кобальта и ртути на функциональное состояние клеток.// "Идеи И.И. Мечникова и развитие современного естествознания". Международная научная конференция, посвященная 150-летию со дня рождения И.И. Мечникова, 28-30 нояб.1995 г. Тез. докл. Харьков, 1995, с.19.

4. Беанзен Г.Ж. Механизм действия ионов ртути и кобальта на состояние эритроцитов и клеток печени.// Материалы научной конференции молодых ученых биологического факультета и научно-исследовательского института биологии ХГУ. Тез. докл. Харьков, 1995, с.9.

5. Беанзен Г.Ж., Бабенко Н.А., Калиман П.А. Действие тяжелых металлов на липиды и функциональную активность гепатоцитов.// Информационный листок. ИЛ N11. Харьков. ХОРПНТЕ, 1996.

Беанзен Г.Бесохеле Жюстен. Влияние солей кобальта и ртути на липиды и функциональную активность эритроцитов и клеток печени.

Диссертация (рукопись) на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04.- Биохимия и 03.00.13.- Физиология человека и животных. Харьковский Государственный Университет.

Изучен механизм действия хлорида кобальта и хлорида ртути на состав липидов эритроцитов и клеток печени, а также на активность 5'-мононуклеотидазы, Ca^{2+} -АТФазы и Mg^{2+} -АТФазы этих клеток животных различного гормонального статуса. Установлено кратковременное действие

солей этих металлов на липиды и функциональную активность клеток. Было показано сходство в действии обоих солей в более отдаленные сроки их воздействия. Установлено, что действие этих солей направлено на изменение метаболизма липидов в изученных типах клеток и функциональной активности их плазматических мембран, что свидетельствует о выработке защитной реакции и адаптации к стрессу, вызванному действием солей тяжелых металлов.

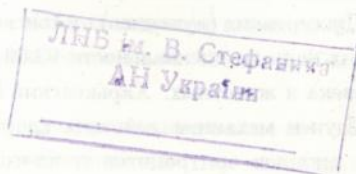
Ключевые слова: фосфолипиды, холестерин, 5'-мононуклеотидаза, Ca^{2+} -АТФаза, Mg^{2+} -АТФаза, хлорид кобальта, хлорид ртути.

Behanzin Gbessohele Justin. The influence of cobalt and mercuriat salts on lipids and functional activity of erythrocytes and liver cells.

Dissertation for the award of candidates degree (Ph.D. of Biology) in the specialities 03-00-04 – Biochemistry and 03-00-13 – physiology of man and animals. Kharkov State University.

The mechanism of action of cobalt chloride and mercuriat chloride on lipid content of erythrocytes and liver cells and activity of 5'-mononucleotidase, Ca^{2+} -АТФase and Mg^{2+} -АТФase of these cells under different hormonal status have been investigated. Short time effect of salts of these metals on lipids and functional activity of cells have been estimated. The similarity of those salts in more prolonged time of experiment have been shown. It was estimated that these salts changes lipids metabolism and functional activity of plasma membranes and it could be the result of organism protective response and adaptation to stress, which courses by the action of heavy metals salts.

Key words: Phospholipids – Cholesterol – 5'-mononucleotidase – Ca^{2+} -АТФase – Mg^{2+} -АТФase – cobalt chloride – mercuriat chloride.



Подп. к печати 10.04.95. Формат 60 x 84 1/16.
Объем 1,0 усл.-печ.л.; 1,0 уч.-изд. л. Тираж 100.
Заказ 168.

Участок оперативной печати ХГАУ. 312131, п/о "Коммунист-1",
учебный городок.

116410

AB 34.651

AB 34.651