

УДК 616.314_089.28:[615,465+615,464]-07:616.31.092
© Никонов А.Ю., 2011

ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ ЭНЕРГООБЕСПЕЧЕНИЯ СУБКЛЕТОЧНЫХ ОРГАНЕЛЛ В ПРИСУТСТВИИ СОЕДИНЕНИЙ ХРОМА Никонов А.Ю.

Харьковский национальный медицинский университет

Никонов А.Ю. Исследование в динамике энергообеспечения субклеточных органелл в присутствии соединений хрома // Украинський морфологічний альманах. – 2011. – Том 9, №1. – С. 89-91.

Рассмотрено влияние соединений хрома на содержание АТФ в intactных ядрах тимоцитов, инкубированных в средах с различными моносахаридами, в модельных опытах *in vitro*. Установлено, что хром может взаимодействовать с фосфорилированными субстратами углеводного обмена на уровне клеточных мембран, оболочек ядер, цито- и нуклеоплазм. По мере накопления в ядрах клеток хром нарушает энергетический обмен, ингибирует активности ферментов, катализирующих синтез АТФ, либо АТФ гидролаз.

Ключевые слова: хромовая интоксикация, патогенетические механизмы, металлотоксикоз в ортопедической стоматологии.

Никонов А.Ю. Дослідження динаміки енергозабезпечення субклітинних органел у присутності сполук хрому // Український морфологічний альманах. – 2011. – Том 9, №1. – С. 89-91.

Розглянуто вплив хромових сполук на вміст АТФ в intactних ядрах тимоцитів, що інкубували в середовищах з різними моносахаридами, в модельних дослідах *in vitro*. Встановлено, що хром може взаємодіяти з фосфорильованими субстратами вуглеводного обміну на рівні клітинних мембран, оболонок ядер, цито- та нуклеоплазм. Накопичуючись в ядрах клітин хром порушує енергетичний обмін, інгібує активності ферментів, що каталізують синтез АТФ, або АТФ гідролаз.

Ключові слова: хромова інтоксикація, патогенетичні механізми, металлотоксикоз в ортопедичній стоматології.

Nikonov A.Yu. Research of subcellular organelles energy supply dynamics under effect of chromium compounds // Український морфологічний альманах. – 2011. – Том 9, №1. – С. 89-91.

It was determined effect of chromium compounds on adenosine triphosphatic acid content in intact thymocyte nuclears that were in media with different monosaccharaides in model experiment *in vitro*. It has been ascertained chromium can cooperate with phosphorylatic substrates of carbohydrate metabolism on level of cellular membranes, nuclear membranes, cito- and nucleoplasm's. With accumulation in cellular nucleus chromium disorders energetic metabolism, inhibits activities of ferments, that catalyses synthesis adenosin-triphosphoric acid or adenosin-triphosphoric acid hydrolyses.

Key words: chromium intoxication, pathogenetic mechanism, metallic toxicosis in orthopedic stomatology.

Достижения в области современной стоматологии не снимают проблему диагностики, профилактики и лечения осложнений, возникающих после протезирования больных металлическими конструкциями, содержащими хром [6-9,11,12]. Все это свидетельствует о том, что изучение патогенеза влияния хромовых сплавов на ткани, органы и среды организма является достаточно актуальным в исследованиях возникновения металлотоксикозов в ортопедической стоматологии.

Ранее [5] нами было проведено изучение влияния никеля на динамику ионного состава биоэлементов и биохимических показателей крови при алиментарном или внутрибрюшинном введении экспериментальным животным. Для понимания некоторых патогенетических механизмов влияния хрома на организм, изучение состояния гомеостаза, безусловно, представляет интерес.

Известно, что повреждение клеточных мембран и мембран клеточных органелл является ключевым моментом в возникновении патологических процессов.

В энергообеспечении практически любых живых объектов главная роль отводится высокоэнергизированным мембранным структурам. В

энергизации мембран, как правило, участвует АТФ, катализируемая АТФазами (анионными, катионными). Специфичность их действия зависит от природы организованных структур. Установлено, что половина хрома, поступившего в клетки эукариот, концентрируется в ядерной фракции [4].

В клетках тимуса ядро занимает значительную часть объема. По расчетам Бетела и Клоузена [9], оно должно производить более 50% клеточного пула АТФ.

На основе изложенного мы смоделировали экспериментальные системы (для опытов *in vitro*) с ядрами тимоцитов, в которых предусматривается возможность изучения вероятных механизмов нарушения энергообмена (синтеза и распада АТФ, генерации мембранного потенциала с участием макроэргов и АТФаз и других биохимических механизмов энергетического обмена клеток) в условиях поступления экзогенных субстратов метаболизма углеводов. Энергозависимое поступление в ядро этого фосфорилированного моносахарида позволяет нам изучать транспорт метаболитов через ядерные мембраны.

Работа является фрагментом научно-исследовательской темы «Изучение общих за-

кономерностей патологических процессов и разработка способов их коррекции» (номер гос. Регистрации 0106U001639).

Целью работы явилось исследование характеристик энергообеспечения ядер тимоцитов при хромовой интоксикации *in vitro*.

Материалы и методы. Исследования проведены на половозрелых крысах-самцах популяции Вистар ($n=20$) с исходной массой 0,18-0,21 кг, содержащихся на стандартном рационе вивария. Контрольную группу составили $n=20$ животных. Проводилось изучение влияния трехвалентного хрома (Cr^{+3}) *in vitro* на синтез АТФ в ядрах тимоцитов. Эритроциты выделяли из крови интактных крыс методом центрифугирования на центрифуге ЦЛК при скорости вращения 1500 об/мин. В суспензию эритроцитов из расчета от 50 до 1200 мкмоль/л вводили Cr^{+3} и инкубировали в течение 1 часа в водяной бане при температуре 37°C. Ядра тимоцитов изолировали по методу Олфри [1]. Конечные концентрации ядер пересчитывали на белок (биуретовый метод) и на ДНК. О способности интактных ядер к синтезу АТФ судили по методу Бетела и Клоузена [9]. Моносахариды (глюкоза, глюкозо-6-фосфат, рибозо-5-фосфат) вносились в ходе инкубации. Хром вводили в среду при конечной концентрации использования $5,2 \times 10^{-6}$ М [10]. Исходный уровень АТФ (мкмоль АТФ на мг раствора ДНК) в интактных ядрах определялся ферментативным способом.

В статистической обработке ввиду ограниченности объема исследуемых совокупностей применяли методы непараметрической статистики Колмогорова – Смирнова, Манна – Уитни для несвязанных выборок. Наличие/отсутствие достоверной диагностики в процессе наблюдения подтверждалось при помощи критериев для связанных выборок Вилкоксона и критерия знаков.

Результаты исследования и их обсуждение. В таблице 1 представлены концентрации АТФ в ядрах тимоцитов при внесении растворов солей трехвалентного хрома и моносахаридов, через 30; 60; 120 и 180 минут.

Таблица 1. Влияние хрома ($5,2 \times 10^{-6}$ М) на синтез АТФ ядрами тимоцитов в присутствии моносахаридов ($M \pm m$)*

Время определения концентрации АТФ	Ядра+		
	Глюкоза (10 мкмоль) I система	Глюкозо-6-Ф (10 мкмоль) II система	Рибозо-5-Ф (3 мкмоль) III система
Контроль	0,197±0,009	0,197±0,009	0,197±0,009
30 мин	0,226±0,010	0,237±0,011	0,173±0,008
60 мин	0,214±0,010	0,223±0,010	0,138±0,006*
120 мин	0,169±0,008*	0,172±0,008*	0,091±0,004*
180 мин	0,111±0,005*	0,124±0,001*	0,710±0,003*

Примечание: 1. В ходе инкубации в среду вносились растворы солей трехвалентного хрома и моносахаридов; 2. Контроль без моносахаридов (АТФ эндогенный); 3. ($M \pm m$)*, $p < 0,001$.

Из таблицы 1 видно, что в системах с глюкозой и глюкозо-6-фосфатом в начальных вре-

менных интервалах (30 мин., 60 мин.) наблюдается некоторое увеличение уровня АТФ. В системе с глюкозо-6-фосфатом (II) по сравнению с I системой с глюкозой отмечается незначительное повышение уровня АТФ, что по видимому, объясняется тем, что глюкозо-6-фосфат – метаболически активирует субстрат, по сравнению с глюкозой. Следует отметить, что эта разница, как видно из таблицы, сохраняется на всех этапах эксперимента I, II систем. Заметное снижение концентрации АТФ на более поздних сроках (120 мин, 180 мин), по всей вероятности, можно объяснить влиянием хрома на поступление в ядро (транспорт через ядерную оболочку) моносахаридов. Возможно, ксенобиотик проявляет мембранотропность, в результате чего нарушается функция пермеаз, активных транспортных систем, либо конформационные перестройки организованных структур (белок-липидные компоненты ядерных мембран) обуславливают изменения условий образования комплексов АТФ-АТФаз (фермент-субстратные комплексы), следствием которых могут быть нарушения энергообеспечения транспортных систем интактных ядер.

В то же время уровень АТФ, в I и II системах все-таки поддерживался, по-видимому, за счет анаэробного гликолиза. Нельзя не учитывать и “автономность” ферментативных систем.

В системе с рибозо-5-фосфатом III система наблюдается снижение эндогенного пула АТФ на начальных этапах 30 мин, 60 мин на 12,2% и 29,9% соответственно. Рибозо-5-фосфат как один из основных метаболитов для синтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов нуждается в активном транспорте. Следовательно, АТФ затрачивается на генерацию мембранного потенциала (генерируемого за счет АТФ с участием АТФазы). В более поздние сроки (120 мин, 180 мин) ошущимое снижение АТФ продолжается (на 53,8%, 65,5% соответственно).

Установленные факты логически привели к необходимости проведения исследований в условиях, когда концентрации субстратов в два раза больше, чем в предыдущих опытах, а также с преинкубацией ядер с ними, то есть, как бы моделируются ядра клеток органов – мишеней для хрома.

Из таблицы 2 видно, что даже в два раза повышение концентрации моносахаридов не обеспечивает достаточного образования АТФ в ядрах тимоцитов. Видимо, возможно, моносахарид не переносится через ядерную оболочку с достаточной скоростью. Преинкубация на начальных этапах (60 мин) обуславливает, вероятно, кумуляцию хрома ядрами, следствием которой являются вышеуказанные изменения в интактных ядрах. Это подтверждает первичность токсического действия хрома на уровне морфоструктур клеток и их органелл, нарушений энергетического обмена мембран, а также функций транспортных систем клеток.

Более стабильное содержание АТФ во II модельной системе, но несколько ниже по срав-

нению с контролем без метаболитов, указывает на образование хелатных комплексов хрома фосфорилированными моносахаридами. Некоторое снижение уровня АТФ в II системе в поздние сроки (180 мин.) инкубации можно объяснить снижением скорости аэробного окисления углеводов, анаэробный гликолиз продолжается и поддерживает эндогенный пул АТФ.

Таблица 2. Влияние хрома ($5,2 \times 10^{-6} \text{M}$) на синтез АТФ ядрами тимоцитов в присутствии моносахаридов в повышенной концентрации

Время определения концентрации АТФ	Ядра +		
	Глюкоза (20 мкмоль) I система	Глюкозо-6-Ф (20 мкмоль) II система	Рибозо-5-Ф (6 мкмоль) III система
60 мин	0,117±0.004	0,192±0.007	0,115±0.004
120 мин	0,084±0.003	0,181±0.006	0,091±0.003
180 мин	0,072±0.002	0,149±0.005	0,069±0.002

В III модельной системе наблюдается явное снижение уровня АТФ по сравнению с внесением глюкозо-6-фосфата. Вероятно, АТФ эндогенный используется для активного транспорта рибозо-5-фосфата. Через 180 мин токсический эффект хрома снижается (на 40%) за счет взаимодействия с определенной долей рибозо-5-фосфата, т.е., по-видимому, происходит образование хелатных комплексов (хром-рибозо-5-фосфат).

Выводы. Таким образом, хром может взаимодействовать с фосфорилированными субстратами углеводного обмена, вероятно, на уровне клеточных мембран, оболочек ядер, цито- и нуклеоплазм. Через этот возможный механизм соединениями хрома нарушается обеспечение клеток, прежде всего необходимыми для метаболизма субстратами (энергетически перенос). Указанный путь, безусловно, осуществляется в клетках органов – мишеней для хрома, которые постоянно испытывают локальное действие ионов металла. Хром по мере накопления в ядрах клеток нарушает энергетический обмен, ингибируя активность ферментов, катализирующих синтез АТФ.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Асатиани В.С. Новые методы биохимической фотометрии / Асатиани В.С.-М. – 1965. – 517 с.
2. Бижанова А.Я. Микроанатомия печени и почек у крыс при экзогенном дисбалансе микроэлемента хрома / А. Я. Бижанова // Автореф. дис... канд. мед. наук. – Актюбе, 2002. – 24 с.
3. Мамбеталин Е.С. Действие соединений хрома и других нефротоксичных веществ на мочеполовую систему человека / Е.С. Мамбеталин // Автореф. дис... д-ра. мед. наук. – М., 1992. – 41 с.
4. Москалев Ю.И. Минеральный обмен / Ю.И. Москалев. – М.: Медицина, 1995. – 288с.
5. Никонов А.Ю. Спектрографические исследования органов крыс при различных способах введения нитрида титана / А.Ю. Никонов

// Экспериментальная і клінічна медицина. – 2005. - № 2. – С. 56-60.

6. Никонов А.Ю. Биофизические методы в исследовании особенностей метаболической активности у больных непереносимостью стоматологических ортопедических металлоконструкций / А.Ю. Никонов, В.И. Жуков, О.В. Зайцева // Вісник проблеми біології і медицини. – 2009. – Вип.1. – С. 200 – 204.
7. Никонов А.Ю. Статистический анализ в оценке эффективности использования тиотриазолина при металлотороксикации стоматологическими ортопедическими конструкциями / А.Ю. Никонов // Медицина сьогодні і завтра.-2008.- №2.-С.59-66.
8. Скальный А.В. Химические элементы в физиологии и экологии человека / А.В. Скальный. – М.: Издательство дом «Оникс 21 век»: Мир, 2004. – 216 с.
9. Betel I. Oxidative phosphorylation in isolated rat thymus nuclei / I. Betel, H. Klowen // Biochem. Acta. – 1967. - № 131. – p.453.
10. Cingi M.R. Choice and standardization of test protocols in cytotoxicology / M.R. Cingi, Z. De Angelis, E. Fortunati // A Multicenter Approach Toxic in vitro. – 1991. – Vol. 5, №2. – P. 119 – 125.
11. Di Giampaolo L. “In vitro” comparative immune effects of different titanium compounds / L. Di Giampaolo, M. Di Gioaccino, J. Ponty // Int. J. Immunopathol. Pharmacol. – 2004. – № 17 (2). – P. 115 – 122.
12. Knoernschild K.L. Periodontal tissue responses after insertion of artificial crowns and fixed partial dentures / K.L. Knoernschild, S.D. Cambell // J. Prostet. Dent. – 2000. – №5. – P. 492 – 498.

Надійшла 15.10.2010 р.

Рецензент: проф. С.А.Кашенко