

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА ОБЩЕЙ ХИМИИ

Е.В. БАРКОВСКИЙ, Т.В. ЛАТУШКО

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ СВИНЦА

Монография

Под общей редакцией Е.В. Барковского



Минск 2006

Барковский, Е. В. Молекулярные основы цитотоксичности свинца : монография / Е. В. Барковский, Т. В. Латушко ; под общ. ред. Е. В. Барковского. – Мн.: БГМУ, 2006. – 99 с. – ISBN 985–462–535–4.

Монография посвящена проблеме токсического действия ацетата свинца на иммунокомпетентные клетки. Она состоит из 6 разделов, в которых описаны современные представления об источниках, путях поступления в организм и механизмах действия соединений свинца, данные о состоянии макромолекулярных биосинтетических процессов (синтеза ДНК, РНК, белка), роли перекисного окисления липидов, кальций-кальмодулиновой системы, циклических нуклеотидов и простагландинов в механизмах токсического действия ацетата свинца на спленоциты крыс. В монографии представлена гипотетическая схема цитотоксического действия ионов свинца на иммунокомпетентные клетки.

Предназначается для биохимиков, иммунологов, аллергологов, врачей-гигиенистов различного профиля, врачей, занимающихся профессиональной патологией и других специалистов, интересующихся новыми аспектами токсического воздействия ионов свинца на клеточном и молекулярном уровнях.

Табл. 17. Ил. 16. Библиогр.: 242 назв.

Утверждено Советом Бел. гос. мед. универ.

Рецензенты:

засл. деят. наук Республики Беларусь, д-р мед. наук, проф. каф. биохимии Белорусского государственного медицинского университета В.К. Кухта; засл. деят. наук Республики Беларусь, д-р мед. наук, проф.-консульт. Минского городского консультационно-диагностического центра В.Г. Колб

ВВЕДЕНИЕ

Современный век характеризуется постоянно расширяющимся применением во всех отраслях народного хозяйства различных соединений металлов. На сегодняшний день предметом токсикологического изучения являются около 80 металлов, встречающихся в окружающей среде, 45 из которых широко используются в различных отраслях промышленности, а 20 оказывают специфическое действие на организм человека [120]. Особую опасность среди них представляют высококумулятивные и стабильные, к числу которых относится и свинец.

Свинец — один из повсеместно распространенных тяжелых металлов в окружающей среде. В настоящее время он является причиной многих экологических и медицинских проблем [121].

Число людей, контактирующих с различными соединениями свинца, постоянно растет не только на производстве [24, 37, 67], но и в результате загрязнения атмосферы, почвы, воды выбросами, содержащими соединения свинца, и соответственно, в результате накопления их в растениях, в организмах животных и рыб [20, 149, 180]. Каждый современный город можно рассматривать как искусственную биогеохимическую провинцию, обогащенную свинцом [47].

Угрожающе быстрое загрязнение окружающей среды металлами, и в частности соединениями свинца, делает проблему изучения механизмов их токсического действия на организм человека чрезвычайно актуальной.

Экологическое отравление (эндоэкологическая патология) принципиально отличается от производственного своей глобальностью. Основным проявлением эндоэкологической патологии среди населения является взрывоподобное нарастание экологически обусловленного массового падения иммунозащитных функций организма, и её начальная симптоматика обычно предопределяется вторичным иммунодефицитом [64].

В последнее десятилетие произошло изменение структуры заболеваемости, что проявилось ростом частоты аллергических болезней человека как на производстве, так и вне его [48]. Особенно возросла частота аллергических заболеваний, вызываемых соединениями металлов. В современных условиях соединения целого ряда металлов оказались ведущими аллергенами, и именно ими определяется уровень профессиональной патологии [48].

Таким образом, металлопатология из сугубо локальной медицинской проблемы в недалеком прошлом вышла в современных условиях на одно из первых мест по распространенности и приобрела в связи с этим крупное экономическое, социальное и экологическое значение.

В литературе накоплен обширный материал, свидетельствующий о том, что соединения свинца оказывают влияние на клеточный и гуморальный иммунитет, а также активность неспецифических иммунологических механизмов [48, 69, 73, 74, 179, 145]. Наиболее частой находкой исследователей является супрессия В-клеток, дисфункция Т-клеток и макрофагов под влиянием соединений свинца [172]. Ряд исследований, подтверждающих иммунотоксичность свинца, основан на обнаружении снижения способности противостоять бактериям и вирусам, что не всегда коррелирует с иммунными дефектами [101, 104]. Множественные эффекты воздействия соединений свинца на иммунную систему и её компоненты позволяют предположить существование более чем одного механизма, ответственного за иммуносупрессию [172].

Согласно традиционным представлениям, механизм токсического действия ионов свинца на молекулярном уровне связан с ингибированием ряда SH-содержащих ферментов, а также снижением концентрации восстановленного глутатиона [9, 18, 38, 50, 96].

Ряд современных данных о структуре и физико-химических свойствах внутриклеточных Ca^{2+} -связывающих белков позволяет с уверенностью считать, что они могут связывать не только ионы кальция, но и ионы тяжелых металлов, особенно ионы свинца [139]. Однако конкретных данных о роли кальмодулина в изменении метаболизма иммунокомпетентных клеток под влиянием ионов Pb^{2+} в литературе не обнаружено. До сих пор остается невыясненной роль трансмембранных потоков ионов кальция в цитотоксическом действии ионов свинца. Интерес к ней вызван тем, что в течение последних лет в литературе стали накапливаться факты об общем конечном пути гибели клеток при воздействии различных цитотоксических агентов [188]. Согласно данной концепции, при действии цитотоксических веществ на клетки происходит повреждение клеточных мембран, изменение их проницаемости и значительное поступление ионов кальция внутрь клеток, которое приводит к различным биохимическим изменениям, в том числе к разрушению цитоскелета, фрагментации ДНК, Ca^{2+} -зависимой активации фосфолипаз, протеаз, эндонуклеаз, что в конечном итоге индуцирует гибель клеток [184, 188].

Монография является, в основном, обобщением результатов исследований интенсивности макромолекулярных биосинтетических процессов в спленоцитах крыс при свинцовой интоксикации, проводившихся сотрудниками кафедры общей химии БГМУ, начиная с 1990 г.

В главе 3 подробно рассмотрены данные о состоянии макромолекулярных биосинтетических процессов в Pb^{2+} -обработанных спленоцитах и

при свинцовой интоксикации. Доказано, что на начальных этапах культивирования клеток в присутствии ацетата свинца наблюдается достоверное увеличение включения радиоактивных предшественников в ДНК и РНК Pb^{2+} -обработанных спленоцитов по сравнению с контролем. Увеличение длительности культивирования спленоцитов приводит к нивелированию описанного выше эффекта, а затем наступает фаза уменьшения включения 3H -тимидина и 3H -уридина в ДНК и РНК Pb^{2+} -обработанных спленоцитов по сравнению с контролем. Впервые обнаруженный нами фазный характер включения радиоактивных предшественников в ДНК и РНК спленоцитов крыс под воздействием ацетата свинца *in vitro* указывает на необходимость проведения именно кинетических исследований при оценке влияния соединений свинца на интенсивность макромолекулярных биосинтетических процессов.

Продемонстрировано, что на стадии повышенного включения 3H -уридина в общую клеточную РНК Pb^{2+} -обработанных спленоцитов интенсивность синтеза тотальной быстрометящейся РНК (бмРНК) не изменена по сравнению с интактными клетками, но обнаружены разнонаправленные изменения синтеза различных типов бмРНК. Так, синтез 45S пре-рРНК достоверно угнетен, а синтез суммарного пула гетерогенной ядерной РНК (гяРНК) + пре-тРНК + актиномицинустойчивой РНК, наоборот, активирован по сравнению с интактными спленоцитами. Результаты пульс-чейз экспериментов с использованием актиномицина Д служат аргументом в пользу представлений о стабилизации ионами свинца структуры РНК и (или) угнетения активности рибонуклеаз на ранних стадиях культивирования клеток с ацетатом свинца.

Показано, что на стадии изменения включения 3H -уридина в общую клеточную РНК наблюдается угнетение РНК-синтетической активности и синтеза всех типов бмРНК под влиянием ацетата свинца в спленоцитах крыс. Эти результаты свидетельствуют в пользу общетоксического действия ацетата свинца на клетки при длительном культивировании Pb^{2+} -обработанных спленоцитов.

В опытах *in vivo* установлено, что в динамике свинцового отравления также наблюдается фазный характер изменений интенсивности синтеза ДНК, РНК и белка в спленоцитах опытных животных. Характер ответа зависит от интенсивности и продолжительности действия ацетата свинца.

Установлен факт значительного несоответствия между степенью угнетения синтеза РНК (~ на 82 %) и синтеза белка (~ на 44 %) в спленоцитах опытных крыс на 20-е сутки свинцовой интоксикации (5 мг Pb^{2+} /кг ежедневно внутрибрюшинно). Эти данные позволили выдвинуть нам по-

ложение об активации ацетатом свинца предсуществующих в цитоплазме спленоцитов стабильных долгоживущих мРНК и, возможно, использовании предсуществующих первичных транскриптов различных типов РНК.

Глава 4 посвящена роли перекисного окисления липидов, кальций-кальмодулиновой системы, циклических нуклеотидов и простагландинов в механизмах цитотоксического действия ацетата свинца.

Нами установлено, что под влиянием ацетата свинца в спленоцитах крыс наблюдается активация процессов перекисного окисления липидов, увеличение внутриклеточной концентрации цАМФ и ПГФ_{2α}. Полученные данные позволяют предполагать, что цитотоксическое действие ионов свинца на спленоциты реализуется через цАМФ- и ПГФ_{2α}-зависимые процессы. Показано, что внеклеточные ионы кальция и низкомолекулярные тиоловые соединения играют защитную роль в цитотоксическом действии ацетата свинца на спленоциты крыс.

В заключение предлагается гипотетическая схема изменения функционального состояния спленоцитов под воздействием ионов свинца. Согласно ей, ионы свинца влияют на основные характеристики спленоцитов, включая синтез и накопление ДНК, РНК, белка, процессы перекисного окисления липидов, концентрацию циклических нуклеотидов и простагландинов, определяющих функциональную активность иммунокомпетентных клеток.

Результаты работы могут служить базой для дальнейших исследований прикладного характера, связанных с применением тиоловых и Са²⁺-содержащих препаратов для профилактики и лечения свинцовых интоксикаций.

Авторы отдают себе отчет в том, что их представления далеки от совершенства. Возможно, некоторые факты в книге были оценены слишком пристрастно, поэтому все критические замечания будут восприняты с благодарностью.

Особую признательность хотелось бы выразить кандидату биологических наук, доценту кафедры общей химии Л.И. Пансевич и сотрудникам Центральной научно-исследовательской лаборатории БГМУ С. Петренко и Н. Гомолко за оказанную помощь в проведении экспериментов и обсуждении полученных результатов.

И, наконец, мы хотели бы выразить слова огромной благодарности О.И. Смирновой, за неоценимую помощь в компьютерной обработке данных и оформлении данного издания.

Глава 1

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ОБ ИСТОЧНИКАХ, ПУТЯХ ПОСТУПЛЕНИЯ В ОРГАНИЗМ И МЕХАНИЗМАХ ДЕЙСТВИЯ СОЕДИНЕНИЙ СВИНЦА

1.1. ОСНОВНЫЕ ИСТОЧНИКИ И ПУТИ ПОСТУПЛЕНИЯ В ОРГАНИЗМ СОЕДИНЕНИЙ СВИНЦА

В условиях быстрого развития промышленности, транспорта, сельского хозяйства и вовлечения в эксплуатацию все большего количества природных ресурсов возрастает уровень воздействия на население различных факторов: химических, физических, биологических, влияющих на здоровье населения [52].

Среди различных химических загрязнителей окружающей среды особую опасность представляют металлы, особенно высококумулятивные и стабильные (к их числу относится и свинец), которые широко используются в промышленности и в большом количестве находятся в воздухе, почве и воде современных городов.

Данные токсикометрии позволили установить сравнительную токсичность всех металлов периодической системы Д.И. Менделеева и подчеркнуть большие различия в ней [48]. Если токсичность натрия принять за единицу, то токсичность ртути будет почти в 2300 раз выше. Все металлы по степени токсичности можно разделить на три группы (табл. 1.1): высокотоксичные, умеренно токсичные и малотоксичные.

Таблица 1.1

Сравнительная токсичность ионов металлов

Группа элементов	Элементы
Высокотоксичные	Ртуть, уран, индий, кадмий, медь, таллий, золото, ванадий, платина, бериллий, серебро, цинк, никель, висмут
Умеренно токсичные	Марганец, хром, палладий, свинец, осмий, барий, иридий, олово, кобальт, галлий, молибден, гафний, скандий, иттрий, технеций, сурьма, рутений, родий, торий, лантан, лантаноиды
Малотоксичные	Алюминий, железо, германий, цирконий, кальций, ниобий, магний, стронций, цезий, рубидий, рений, тантал, вольфрам, литий, титан, натрий

Наиболее многочисленная группа умеренно токсичных металлов, в которую входит и свинец, характеризуется способностью вызывать в реальных условиях хронические отравления с довольно разнообразными, часто тяжелыми, клиническими проявлениями.

Следует принять во внимание, что величина DL_{50} , по которой сравнивается токсичность металлов, в данном случае важна чисто теоретиче-

ски, так как позволяет трактовать связь токсичности с физико-химическими свойствами металлов. В действительности она далеко не всегда отражает степень опасности токсического действия металла в производстве, которая зависит одновременно и от других условий. Степень опасности действия металлов может быть оценена по существующей классификации токсичности веществ, в основу которой положена ПДК их в воздухе рабочей зоны.

Каждый современный город можно рассматривать как искусственную биогеохимическую провинцию, обогащенную свинцом [47]. Главные источники свинца в окружающей среде, которые имеют значение для здоровья человека, связаны с применением свинца в промышленности: радиотехнической, химической, автомобильной, аккумуляторной, полиграфической, кабельной, фарфорофаянсовой, гончарной, в производстве стекла и красок и др.

Многочисленными исследователями свинец рассматривается как профессиональный яд. Изучение проблемы профессиональной гигиены, проведенное ВОЗ, показало, что из 3370 рабочих, обследованных в Колумбии, которые подвергались воздействию свинца, 4,3 % страдали свинцовым отравлением. Из 20 плавильщиков и литейщиков у 16 концентрация свинца в крови составляла 70 мкг % и больше [227]. При хорошей вентиляции сварка стали, покрытой силикатом цинка, создает концентрацию свинца 180 мкг/м³ в воздухе на уровне лица сварщика и 70 мкг % в его крови. А при отсутствии должной вентиляции даже сварка стали с гальваническим покрытием, создает концентрацию свинца 400–500 мкг/м³ [193].

При этом нужно отметить, что нет единого мнения относительно пусковых уровней свинца в крови, при которых следует ожидать неблагоприятных реакций организма. В Великобритании предложено три пусковых уровня, когда необходимо ограничивать воздействие на организм соединений свинца: первый — до 25 мкг % для детей; второй — от 25 до 50 мкг % — концентрация, которая, возможно, вызывает ответные реакции; и третий — свыше 50 мкг % — концентрация, при которой у отдельных лиц наблюдаются симптомы интоксикации свинцом [212].

Основной вид использования свинца, при котором он широко рассеивается, — это производство и применение алкилсвинцовых присадок к топливу. В выбросах автомобильных моторов неорганические соединения свинца составляют 74 % от его общего содержания [203]. Добавление органических соединений свинца в бензин обуславливает его ежегодный

выброс в окружающую среду 230000 тонн. 75 % выбрасываемого свинца поступает в атмосферный воздух в виде аэрозоля с размером частиц меньше 1 мкм [93]. Время пребывания во взвешенном состоянии этих частиц измеряется несколькими днями и зависит от выпадения осадков.

Эпидемиологические исследования в странах ЕЭС показали, что среднее содержание свинца в крови у людей равно 13 мкг %, а у 3 % обследованных оно превышает 30 мкг %. Свинец из выбросов автотранспорта в общей нагрузке среднего жителя промышленно развитых стран составляет 6 мкг %. Во многих странах существуют максимально допустимые уровни содержания свинца в бензине, они колеблются в пределах 0,15–0,52 г/л. Япония и Канада с 1974 г. производят бензин, не содержащий свинец. Концентрация свинца в крови жителей Токио составляет в среднем 6,4 мкг % [93].

Концентрация свинца в атмосферном воздухе варьирует от 2–10 мкг/м³ в больших городах с интенсивным движением автотранспорта, до 0,2 мкг/м³ и менее в большинстве пригородных зон и в сельской местности. Свинец, который выбрасывается в воздух в районах с высоким движением автотранспорта, выпадает, главным образом, внутри этой городской зоны.

В США большую тревогу вызвало выявление ненормально повышенных уровней свинца в крови у значительного числа детей, живущих во внутренних районах городов. Содержание свинца у них достигало 40–80 мкг % [197].

Атмосферный воздух в непосредственной близости от сталеплавильных заводов, в гаражах может быть ощутимо загрязнен (24,0–80,0 мкг/м³ [117,161] и 11,7 мкг/м³ [191] соответственно), и вредно воздействовать на население в целом. От 13 до 30 % детей, живущих в радиусе 300 м от труб плавильных заводов, имели уровень свинца в крови более 40 мкг % [202].

Исследования ряда авторов указывают на корреляцию уровней свинца в атмосферном воздухе с уровнями свинца в крови у населения в целом. Так, уровни свинца в воздухе могут вносить вклад от 1,0 до 2,0 мкг свинца на 100 мл крови на 1 мкг свинца в 1 м³ воздуха [72, 134, 224].

Воздействие свинца на организм человека через воду обычно более низкое, чем через атмосферный воздух и пищу [11].

Концентрация свинца в питьевой воде обычно меньше 10 мкг/л [118], но в некоторых местах, где вода мягкая (низкое содержание солей кальция и магния), и где в то же время используются свинцовые трубы и

освинцованные резервуары для хранения воды, концентрация его может достигать 2000–3000 мкг/л [129,133]. Известно, что в Великобритании 5 млн человек проживает в домах, централизованное водоснабжение которых обеспечивается системами, оснащенными свинцовыми трубами. У многих англичан в крови находят свинец в концентрациях до 50–150 мкг %. Наиболее угрожающее положение сложилось в районах, где подаваемая вода имеет $pH < 5$, что способствует растворению свинца из свинцовых труб. До недавнего времени существовало мнение, что при большом водо-заборе в течение дня (на протоке) свинец не будет успевать вымываться из свинцовых труб и, таким образом, не будет угрозы для населения, однако было установлено быстрое вымывание свинца водой из свинцовых труб даже при застое воды в системе в течение 30 мин [162].

Определена степенная зависимость содержания свинца в крови от концентрации свинца в воде, поэтому даже сравнительно низкие (< 40 мкг/л) величины свинца в воде могут существенно влиять на содержание свинца в крови [209].

Отмечают, что повышение концентрации свинца в питьевой воде может также наблюдаться в трубах из оцинкованной стали, поскольку в цинке, используемом для этих целей, содержание свинца составляет 0,6–0,8 % [171]. В воде открытых водоемов концентрация свинца в районах источников его выбросов возрастает и может превышать предельно допустимую для стран ЕЭС (0,05 мг/л) в 50–100 раз, становясь фактором риска для населения [93].

Исследования содержания свинца в почве показывают, что он значительно накапливается в почве вблизи автомагистралей и крупных сталеплавильных заводов [92, 199]. В Минске установлена величина годовой аккумуляции свинца в почве: на улицах с интенсивным автомобильным движением она составила 2,8–3,5, а в загородной зоне — 0,4–0,6 мг/кг, что связано с общим насыщением атмосферы аэрозолями, содержащими свинец [10].

Предлагаются два основных подхода к оценке степени загрязнённости почв: первый связан с опасностью содержания свинца в пищевых продуктах (допустимый уровень в Великобритании 1 мкг/г). Для обеспечения содержания свинца в зерновых и других сельскохозяйственных культурах на этом уровне содержание свинца в почве не должно превышать 1100 мкг/г. В качестве второго подхода рекомендуют контроль за содер-

жанием свинца в крови детей, величина которого на уровне 25 мкг % свидетельствует о концентрации свинца в почве 1000–2000 мкг/г.

Следовательно, при содержании свинца меньше 1000 мкг/г почвы можно считать «чистыми» [111].

Загрязнение почвы свинцом приводит к повышению содержания его в продуктах питания, в основном, растительного происхождения. За последние 100 лет концентрация свинца в растениях увеличилась в 4 раза [155]. Доля свинца, поступающего в организм человека с пищевыми продуктами, широко варьирует. Суточное поступление свинца с пищей среднего француза составляет 200 мкг, бельгийца и итальянца — 400–500 мкг, англичанина и шведа — 100 и 30 мкг соответственно [93].

Никакого специфического вида пищи, содержащей особенно высокое количество свинца, не было выявлено, за исключением вина и пищевых продуктов, которые хранились в банках, запаянных свинцом, или в глиняной посуде, покрытой свинцовой глазурью. Можно считать средней концентрацией свинца в вине 130–190 мкг/л (пределы 60–299 мкг/л) [87]. Поэтому вино, по-видимому, является важным источником свинца для некоторых людей и может считаться причиной известных различий в суточном поступлении свинца с пищей в разных странах.

Концентрация свинца в молоке — предмет особого беспокойства, поскольку молоко представляет собой главную составную часть питания грудных детей. Женское молоко содержит свинец в количестве 5–12 мкг/л [160, 182]. В единичных пробах обнаруживаются резко повышенные количества свинца (до 1,62 мг/л) [99], что связывают с воздействием выхлопных газов, возрастом дома (краска на свинцовом сурике в старых домах), свинцом, содержащимся в уличной пыли, загрязненной осадениями из атмосферы, даже потреблением более трех чашек кофе за 24 ч до начала выделения материнского молока (кофе мобилизует свинец из депо) [110]. Коровье молоко имеет концентрации подобные материнскому молоку (9 мкг/л) [142]. Концентрация свинца в коровьем молоке, подвергшемся обработке, выше, чем в женском молоке или в молоке, полученном непосредственно от коровы, и в среднем составляет 40 мкг/л [176].

Осаждение свинца из атмосферного воздуха на поверхности почвы и при вторичном переносе из почвы в растения, от растений к животным, а затем к человеку по так называемым пищевым цепочкам приобретает всё большую актуальность в районах Беларуси, пострадавших от аварии на Чернобыльской АЭС.

Поступление в организм свинца с пищей, водой и из атмосферного воздуха является главной проблемой для населения в целом в силу всепроникающей природы таких воздействий.

1.2. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ В ОРГАНИЗМЕ И МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ СОЕДИНЕНИЙ СВИНЦА

Нагрузка организма свинцом растет от момента рождения до старости [77]. Как и все вещества, поступающие в организм, свинец в разовой дозе сначала распределяется в соответствии со скоростью доставки крови к различным органам и системам. Затем происходит перераспределение среди органов и систем пропорционально присущему им сродству к свинцу. Свинец имеет сильно выраженную тенденцию локализоваться и накапливаться в костях. Так, около 90–95 % от общего количества свинца в организме у взрослых, не подвергавшихся профессиональным воздействиям, находится в костях [78, 207].

Другие органы и системы обладают меньшей способностью аккумулировать свинец, и содержание свинца в них достигает стабильного уровня сравнительно рано, что отражает более быстро происходящий обмен свинца, чем в костях.

При оценке содержания свинца у крупных животных, относящихся к пищевой цепи человека, обращает на себя внимание факт значительного накопления его в печени и почках [125].

Особый интерес представляют сведения о распределении ионов Pb^{2+} между различными клеточными органеллами. Так, в соответствии с кинетической моделью стационарных потоков и уровней свинца в гепатоците (рис. 1.1) 85 % Pb^{2+} (1,5 нмоль/мг белка) связано с митохондриями; 5 % (0,14 нмоль/мг белка) находится в эндоплазматическом ретикулуме, лизосомах, ядре; 8 % (0,08 нмоль/мг белка) связано с фосфолипидами, белками, АТФ и другими компонентами цитозоля [18]. В модели не учтено количество свинца, находящегося на клеточной мембране.

Свинец легко проникает через плаценту, и концентрация его в крови новорожденного такая же, как и у матери [138].

В литературе накоплено множество прямых и косвенных доказательств в пользу того, что развитие патологических процессов, обусловленных действием соединений свинца, может иметь в своей основе как иммунные, так и неиммунные механизмы. Иммунные реакции при всех их многообразии способствуют, в сущности, одному — адаптации орга-

низма к данным условиям, сохраняя при этом антигенное постоянство, генетическую «чистоту» организма.

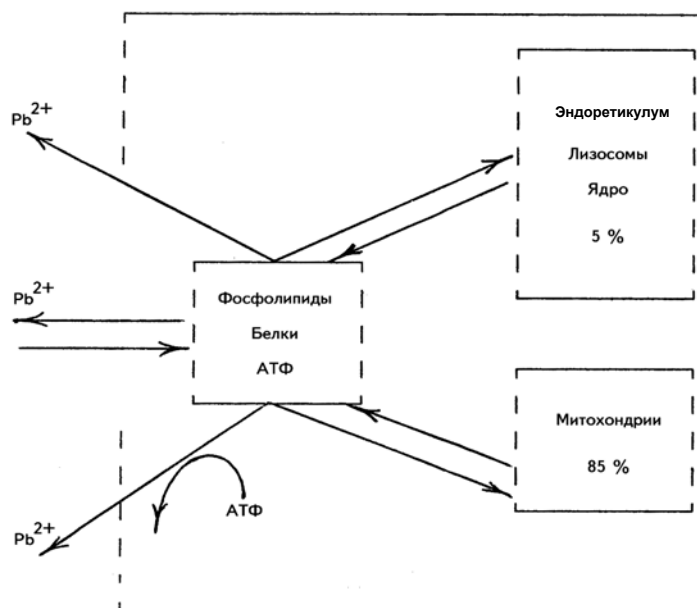


Рис. 1.1. Кинетическая модель стационарных потоков и уровней свинца в гепатоците

Сами по себе тяжелые металлы и их соли не являются антигенами, т. е. по отношению к ним не происходит специфической иммунной реакции, но, вступая в организме в соединение с белками, последние приобретают новые свойства, в том числе, способность стимулировать иммунокомпетентную систему [48]. Иными словами, комплекс металл-белок приобретает антигенные свойства в результате изменения вторичной и третичной структуры белка и может привести к сенсibilизации организма, где металлу принадлежит решающее значение в специфичности процесса: он выполняет роль гаптена. Отсюда становится понятной возросшая частота аллергических заболеваний, вызываемых химическими соединениями тяжелых металлов, все более широко применяемых во всех отраслях народного хозяйства. Существует мнение о необходимости рассматривать болезни, вызываемые соединениями металлов, как особую группу аллергических болезней — металлоаллергозов [48].

В литературе имеются сведения о способности оксида свинца PbO растворяться в плазме крови человека и образовывать при этом соединения с белками плазмы [48]. Применение ЭДТА и других хелатообразующих веществ снижает связывание PbO с плазменными белками и, что более важно, подавляет его сенсibilизирующее свойство [48].

Не исключено, что образовав химическое соединение с белком, ионы Pb^{2+} способствуют формированию нового и чуждого для организма антигена.

В ответ на антигенный стимул иммунная система отвечает как многокомпонентная организация, функционирующая путем кооперации макрофагов, Т- и В-лимфоцитов, имеющих между собой прямые контакты и взаимодействующих посредством большого числа гуморальных веществ (иммуноглобулины, антитела, интерферон, лимфокины, лейкотриены и т. д.), которые вырабатываются этими клетками.

Следует отметить, что, наряду с иммунной системой как основной, в иммунных реакциях участвуют и многообразные клеточные (полинуклеарные лейкоциты, тромбоциты) и гуморальные (система комплемента, лизоцим) элементы, относимые к так называемым неспецифическим факторам защиты.

Литературные сведения о характере иммунологических сдвигов, выявленных в организме при воздействии соединений свинца весьма немногочисленны и во многом противоречивы.

Исследование первичного иммунного ответа на эритроциты барана в условиях действия тяжелых металлов проведено в культуре клеток селезенки мышей. Оценку вели по числу бляшкообразующих клеток (БОК) и по пролиферативному ответу, вызываемому различными митогенами. На основании иммуносупрессивной активности металлы располагались в следующем порядке: $Hg^{2+} > Cu^{2+} > Mn^{2+} > Co^{2+} > Cd^{2+} > Cr^{2+} > Sn^{2+} > Zn^{2+}$, а Pb^{2+} и Ni^{2+} , наоборот, повышали число БОК. Важно также отметить, что ионы Pb^{2+} в условиях прямого контакта с лимфоцитами усиливали развитие БОК и изменяли их активность [48].

В опытах на иммунизированных морских свинках установлено, что $Cd^{2+} > Zn^{2+} > Pb^{2+}$ усиливали взаимодействие между антигенами (овальбумин) и поверхностью лимфоцитов, эти же металлы отчетливо тормозили продукцию МИФ (миграцию ингибирующий фактор) в лимфоцитах [48]. Эти данные свидетельствуют о том, что тяжелые металлы не только отличаются между собой по интенсивности и механизму действия, но и по влиянию на различные компоненты иммунной системы.

С одной стороны, у здоровых людей, имеющих длительный контакт с оксидами свинца, имело место ослабление митогенной активности Т-лимфоцитов при их стимуляции фитогемагглютинином и конканавалином А, причем, тем более выраженное, чем больший срок контакта со

свинцом был отмечен. Важно указать, что длительный контакт людей с соединениями свинца не вызывал существенного изменения содержания в крови IgG и IgA [69]. С другой стороны, у лиц, подвергающихся воздействию свинца на производстве (содержание свинца в крови 40–51 мкг %), не выявлено отклонений от нормы в митогениндуцированной бласттрансформации, содержании E-розеткообразующих клеток, но супрессорная активность клеток, индуцированная конканавалином А, у этих лиц была достоверно выше, чем у контрольной группы (содержание свинца в крови 10–19 мкг %) [102]. Клиническое значение данного наблюдения неясно, но может быть отражением различных иммунологических дефектов, описанных при воздействии свинца [48].

Durick и соавт. также не обнаружили влияния хлорида свинца на активность бласттрансформации лимфоцитов периферической крови человека, индуцированной фитогемагглютинином [84].

При исследовании влияния ацетата свинца на антителозависимый иммунитет *in vivo* у мышей различных линий не выявлено иммуносупрессивного действия ацетата свинца, т. е. продукция антителообразующих клеток при иммунизации эритроцитами барана не изменена. У мышей всех линий ацетат свинца не влиял на содержание в сыворотке крови антител к эритроцитам барана и содержание в сыворотке IgG, IgM и IgA. Авторы делают вывод об отсутствии супрессивного влияния ацетата свинца на первичный гуморальный ответ у различных мышей с разными гаплотипами H-2 [179].

В модельных опытах *in vitro* на культуре человеческих лимфоцитов, стимулированных фитогемагглютинином, доказано токсическое действие нитрата свинца. Уровень задержки роста и развития культур оценивали путем определения показателя CE_{50} (в моль/л), который в опытах на лимфоцитах для нитрата свинца составляет $10^{-2.5}$ [147].

При культивировании полиморфно-ядерных лейкоцитов человека в присутствии соединений свинца (10^{-4} – 10^{-6} М) в течение 3–20 ч не выявлено выраженных изменений жизнеспособности клеток. В то же время, ионы свинца оказывают значительное снижение фагоцитарной активности, зависимое от концентрации Pb^{2+} . Эти данные свидетельствуют о возможном повреждении полиморфно-ядерных лейкоцитов человека *in vivo* и снижении неспецифической иммунной защиты при загрязнении окружающей среды свинцом [74].

Имеются сведения, что угнетение фагоцитарной активности при отравлении соединениями свинца связано с нарушением обмена электролитов, подавлением дыхательной активности и активности системы миелопероксидазы [104].

Значительный интерес представляют данные о том, что при исследовании *in vitro* ионы Pb^{2+} в концентрации 10^{-6} М подавляют фагоцитарную активность моноцитов человеческой крови в отношении частиц латекса, а в концентрации 10^{-8} М стимулируют ее [241].

При изучении *in vitro* влияния хлорида свинца (50–100 мкМ) на микробицидную активность человеческих полиморфонуклеаров в отношении клеток *Candida albicans* установлено, что 30-минутная преинкубация полиморфно-ядерных лейкоцитов человека с солью свинца вызывала усиление гибели клеток *Candida albicans*, несмотря на ослабление фагоцитарной активности. При 120-минутной преинкубации с хлоридом свинца в супернатантах выявлена достоверная тенденция к повышению активности лизосомальных ферментов лизоцима и β -глюкуронидазы [73].

Инкубация перитонеальных макрофагов в присутствии $PbCl_2$ в концентрации 10^{-6} – 10^{-7} М на протяжении 20 ч не оказывала влияния на жизнеспособность клеток. Количество фагоцитированных частиц в присутствии ионов свинца в концентрации 10^{-4} М снижалось в расчете на 1 клетку с 16,9 до 5,0 [145].

Описаны эффекты острого и хронического воздействия свинца на гуморальный и клеточный иммунный ответ, снижение устойчивости к бактериям, вирусам и паразитарным инфекциям [101, 104].

Анализируя вышеизложенные данные можно предположить, что соединения свинца оказывают влияние на клеточный и гуморальный иммунитет, а также на активность неспецифических иммунологических механизмов. Эффект воздействия свинца на иммунную систему трудно интерпретировать как иммунопотенцирующий, так и иммуносупрессивный [172]. В то время как супрессия В-клеток является наиболее частой находкой, обнаруживается также дисфункция Т-клеток и макрофагов. Ряд исследований, подтверждающих иммунотоксичность свинца, основан на обнаружении снижения способности противостоять бактериям и вирусам, что не всегда коррелирует с иммунными дефектами. Изменение В- и Т-клеточных функций, возможно, приводит к развитию аутоиммунных реакций. Поэтому нефриты и гломерулонефриты, вызванные свинцом, могут также иметь аутоиммунный патогенез.

Многочисленные исследования доказывают, что иммунная система очень чувствительна к химическим повреждениям. Эта чувствительность основана как на общих свойствах тяжелых металлов (например, взаимодействие их с макромолекулами), так и на комплексной природе иммунной системы, которая включает антигенное узнавание и различные клеточные процессы: клеточное взаимодействие, клеточную активацию, пролиферацию, дифференцировку и продукцию (синтез) медиаторов [172].

Соединения свинца имеют множественные эффекты воздействия на функцию иммунной системы, затрудняя выявление последовательности изменений или обнаружение специфичности их клеточно-химического взаимодействия. Расхождение во взглядах на взаимодействие соединений свинца с иммунной системой и ее компонентами позволяет предположить возможность существования более чем одного механизма, ответственного за иммуносупрессию [172].

Рассматривая проблему токсического действия соединений свинца, перейдем к краткому анализу роли неиммунологических нарушений в патогенезе свинцового отравления. Основным направлением таких исследований является изучение влияния соединений свинца на гемопоэз, сердечно-сосудистую, нервную, ренальную, дыхательную, репродуктивную системы и желудочно-кишечный тракт.

Соединения свинца вызывают свинцовую анемию, связываясь с гемоглобином, что приводит к образованию нерастворимых комплексов и снижению длительности жизни эритроцитов [76]. При свинцовой интоксикации наблюдается выделение из эритроцитов ионов калия и нарушение их механической устойчивости [177]. Соединения свинца ингибируют в костном мозге активность гемсинтетазы [132], аминолевулинатдегидрогеназы [37] и копропорфириноксидазы [132], что сопровождается увеличением содержания порфириновых соединений, δ -аминолевулиновой кислоты, уропорфирина, копропорфирина в эритроцитах и моче [65].

Некоторые исследования последнего времени вносят сомнение в сложившееся представление о том, что воздействие свинца ингибирует активность копропорфириноксидазы и феррохелатазы, что, в свою очередь, ведет к нарушению обмена порфиринов, проявляющемуся клиническим увеличением выведения копропорфирина с мочой и накоплением Zn-протопорфирина в эритроцитах [159].

Исследованиями Worsook и соавт. [86] установлено, что в ретикулоцитах крыс под влиянием ионов свинца в концентрации 1 мкМ наблюда-

ется ингибирование синтеза гемоглобина на 18 %. Интересно отметить, что такая же концентрация ионов ртути не оказывала влияния на синтез гемоглобина в ретикулоцитах крыс. Эти результаты позволяют полагать, что влияние ионов свинца на синтез гемоглобина, по-видимому, обусловлено не только связыванием тяжелых металлов с ферментами.

В ретикулоцитах основным местом синтеза гемоглобина являются полирибосомы, состоящие из комплексов рибосома-мРНК [169, 233]. Waxman и Rabinowitz показали, что культивирование ретикулоцитов в присутствии ионов свинца вызывает дезагрегацию полирибосом [234]. Эти данные позволяют объяснить феномены, свидетельствующие о том, что ионы свинца в низких концентрациях являются эффективными катализаторами деполимеризации РНК [42, 122]. Позже были представлены убедительные данные о том, что Pb^{2+} -катализируемая деполимеризация РНК выражена во много раз эффективнее по сравнению с другими тестируемыми ионами металлов [122].

Высокие дозы соединений свинца приводят к энцефалопатии [71, 109, 173, 210, 216, 237]. Имеются данные о том, что свинец в очень низких концентрациях может оказывать влияние на поведение детей [89]. Установлено, что ионы свинца оказывают влияние на синаптическую передачу в периферической нервной системе. Важно, что этот эффект является обратимым по отношению к ионам кальция [156]. В этой связи интересно отметить, что нервно-мышечная блокада диафрагмального нерва, вызываемая соединениями свинца, также снимается ионами кальция [211]. Значение этих исследований для выяснения механизма действия свинца на центральную нервную систему пока еще не установлено.

Обширные исследования, посвященные влиянию соединений свинца на ренальную систему, позволяют сделать вывод о том, что существует два главных типа действия ионов свинца: повреждение почечных канальцев, связанное с нарушением системы переноса аминокислот, глюкозы и фосфатов [98, 136] и хроническая свинцовая нефропатия [106], переходящая в почечную недостаточность. Изучение эпителиальных клеток нефронов показало, что один из основных путей накопления свинца в клетке — образование внутриядерных включений [123, 124]. Одной из функций этих структур является, по-видимому, защита чувствительных биохимических систем от токсического действия свинца.

При воздействии свинца на сердечно-сосудистую систему атеросклеротически поражаются сосуды почек, мозга [41, 116], у части людей при

этом развивается артериальная гипертензия [107]. Есть убедительные доказательства того, что клинические признаки отравления свинцом часто включают и симптомы токсического действия на сердце [115, 126].

Влияние свинца на желудочно-кишечный тракт, чаще всего проявляющееся в возникновении колик и спастических запоров, почти всегда служит ранним предупреждением о потенциальной возможности появления более резких серьезных эффектов при продолжающемся воздействии свинца [39, 82].

Имеются данные о влиянии свинца на репродуктивную систему [215].

Хотя сообщения в литературе о канцерогенном, мутагенном и тератогенном действии свинца носят противоречивый характер, имеются работы, подтверждающие как канцерогенный [189, 229], так и мутагенный [79, 113], и тератогенный [190], и митогенный [114] эффекты при воздействии свинца.

Несмотря на многочисленные исследования, механизмы действия свинца на клеточный метаболизм остаются, в большей степени, неясными. Поэтому, на наш взгляд, представляется целесообразным в заключительной части этой главы рассмотреть основные механизмы токсического действия ионов свинца на молекулярном уровне.

Современная точка зрения на механизм токсического действия соединений свинца, основанная на данных о структуре и физико-химических свойствах внутриклеточных кальций-связывающих белков (кальмодулина, тропонина С, парвальбумина), позволяет с уверенностью считать, что эти белки могут связывать не только ионы кальция, но и ионы тяжелых металлов, особенно ионы свинца и кадмия. Объем такого связывания и его значение еще недостаточно ясны, хотя некоторые данные позволяют говорить о его роли в определенных биологических эффектах этих ионов [139].

В таблице 1.2 приведены некоторые данные физико-химических исследований, свидетельствующие о связывании ионов тяжелых металлов с основным внутриклеточным рецептором ионов кальция, — кальмодулином [96].

Поскольку ионы свинца, кадмия и ртути эффективно конкурируют с ионами кальция за связывание с кальмодулином, то повышенный уровень их внутриклеточной концентрации может активировать кальмодулин. Это создает ситуацию, при которой активность кальмодулина может регулироваться не только потоком ионов кальция внутрь клетки, но и потоками

ионов тяжелых металлов. Длительная активация кальмодулина ионами тяжелых металлов, несомненно, приведет к серьезным нарушениям многих клеточных функций, что и может составлять молекулярную основу их токсичности.

Таблица 1.2

Корреляция между ионным радиусом катионов металлов и их эффективностью индуцировать изменения тирозиновой флуоресценции, электрофоретической подвижности и активности кальмодулина

Катион	Радиус, А	Флуоресценция (изменение, %)	Изменение подвижности	Активность фосфодиэстеразы
Cd^{2+}	0.97	111	+	90
Ca^{2+}	0.99	100	+	100
Hg^{2+}	1.1	75	-	73
Pb^{2+}	1.2	47	+	92

Не исключено, что взаимодействие ионов тяжелых металлов с кальмодулином и последующая активация кальмодулин-зависимых ферментов наблюдается только при их избыточном поступлении в цитозоль.

Существует и альтернативная традиционная гипотеза о том, что причиной токсичности тяжелых металлов является их взаимодействие с SH-группами ферментов [96]. В этом аспекте необходимо указать на ингибирование активности большого количества ферментов ионами свинца. Так, ионы свинца оказывают ингибирующее влияние на активность протеинкиназы С [164], цитохромоксидазы [9, 38, 50], что приводит к нарушению окислительно-восстановительных процессов в клетке. Имеются данные о влиянии соединений свинца на активность лизосомальных ферментов в печени, сердце, почках и гонадах [3, 7, 63].

Известно, что клетки млекопитающих содержат миллимолярные концентрации восстановленного глутатиона и металлотионеинов, которые предоставляют SH-группы для хелатирования ионов тяжелых металлов [96], выполняя таким образом защитную роль.

На основании вышеизложенного видно, что феноменологические аспекты эффектов токсического воздействия соединений свинца на организм достаточно широко исследованы. Вместе с тем, вопрос о молекулярных механизмах их цитотоксического действия, в частности, на иммунокомпетентные клетки, до сих пор недостаточно разработан.

Глава 2 ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О МЕТОДИКАХ ПРОВОДИВШИХСЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. ЛАБОРАТОРНЫЕ ЖИВОТНЫЕ, ПРИГОТОВЛЕНИЕ КЛЕТОЧНОЙ СУСПЕНЗИИ И ЕЕ ХАРАКТЕРИСТИКА

1. Исследования проводились на крысах-самцах линии Wistar массой 180–220 г, содержащихся на обычном рационе вивария.

2. Исходной клеточной популяцией являлась популяция клеток селезенки экспериментальных животных. Животных декапитировали. Селезенку извлекали в асептических условиях и гомогенизировали в среде 199, мягко раздавливая в стеклянном гомогенизаторе. Полученную взвесь клеток пропускали через капроновую сетку. Лизис эритроцитов осуществляли 10-минутной инкубацией в 0,83 %-ном растворе NH_4Cl , забуференном 0,01 М трис- HCl буфером (рН 7,4). Клетки дважды отмывались средой 199. Полученную клеточную популяцию свежеизолированных нефракционированных спленоцитов разводили средой 199 + 15 мМ буфера HEPES (рН 7,8) до концентрации $5 \cdot 10^6$ клеток на 1 мл культуры и культивировали в присутствии ацетата свинца (1–100 мкМ) в стандартных флаконах при температуре 37 °С. Контролем служила суспензия клеток, в которую вместо ацетата свинца добавляли соответствующий объем среды 199. Жизнеспособность спленоцитов оценивали по тесту исключения живыми клетками красителя трипанового синего [43].

3. Чистоту полученной клеточной суспензии оценивали с помощью электронной микроскопии по общепринятой методике. Срезы просматривали на электронном микроскопе марки JEM-100 CX (Япония) или ЭВМ-100 Л (СССР).

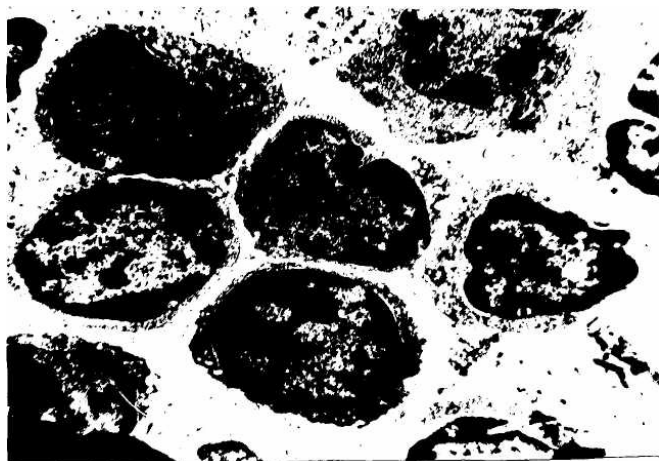


Рис. 2.1. Электронная микрофотография спленоцитов крысы-самца Wistar (увеличение $\times 5800$)

На рисунке 2.1 представлены данные электронно-микроскопического исследования суспензии выделенных спленоцитов.

2.2. РАДИОИЗОТОПНЫЕ И РАДИОИММУННЫЕ МЕТОДЫ

1. Измерение включения радиоактивного тимидина в ДНК спленоцитов. В опытах использовали ^3H -тимидин (В/О «Изотоп», СССР). Синтез ДНК оценивали по количеству радиоактивного тимидина, включенного в ДНК спленоцитов [174].

2. Измерение включения радиоактивного уридина в РНК спленоцитов. В качестве специфического предшественника РНК использовали ^3H -уридин (В/О «Изотоп», СССР).

3. РНК-синтетическую активность спленоцитов оценивали по включению ^3H -уридина в кислотоосаждаемый (ТХУ) материал клеток, меченых в течение 15 мин, так как за этот промежуток времени можно пренебречь вкладом распада новосинтезированной РНК в количество включенного радиоактивного предшественника в быстрометящейся РНК (бмРНК) [51].

4. Для изучения стабильности новосинтезированной РНК использовали методический прием, основанный на кратковременной инкубации клеток с ^3H -уридином и дальнейшем культивировании в присутствии актиномицина Д в концентрациях, полностью подавляющих синтез РНК (пульс-чейз-эксперимент). Пульс-чейз-эксперименты проводили на свежееизолированных интактных спленоцитах и спленоцитах, предварительно обработанных ацетатом свинца в концентрации 10 мкМ в течение 1 ч. Чейз-эксперименты проводили с использованием актиномицина Д в концентрации 10 мкг/мл.

5. Определение доли актиномицинустойчивой фракции среди суммарных быстрометящихся ^3H -уридином РНК спленоцитов проводили с использованием актиномицина Д в концентрации 10 мкг/мл [217].

6. Определение доли 45S пре-рРНК в общем пуле быстрометящихся РНК проводили с помощью метода селективного ингибирования синтеза рибосомных РНК низкими концентрациями актиномицина Д [23]. Для ингибирования синтеза 45S пре-рРНК использовали актиномицин Д в концентрации 0,15 мкг/мл [45].

Время преинкубации клеток с актиномицином Д во всех экспериментах составляло 1 ч, так как в течение этого времени достигается максимальное подавление синтеза РНК [195].

7. Накопление общего пула новосинтезированной РНК в спленоцитах оценивали по включению ^3H -уридина в кислотонерастворимую фракцию клеток, меченых в течение 2–10 ч, т. е. времени, достаточного для включения метки во все типы быстрометящихся РНК, их процессинга и выхода зрелых молекул в цитоплазму.

8. Измерение синтеза белка в спленоцитах. В экспериментах использовали ^{14}C -гидролизат белков хлореллы (UVVVR, ЧССР). К 1 мл клеточной суспензии добавляли 5–10 мкКи радиоактивных предшественников на весь период культивирования.

Во всех экспериментах после окончания культивирования клетки обрабатывали 10 %-ной трихлоруксусной кислотой. Нерастворимую фракцию переносили на мембранные фильтры и определяли радиоактивность фильтров в диоксановом сцинтилляторе на жидкостном сцинтилляционном счетчике СБС-2 (СССР) или «Beckman» (США).

Количественные данные о включении радиоактивных изотопов в ДНК, РНК и белок спленоцитов представляют собой среднее арифметическое измерений в 4–6 параллельных культурах и выражены в импульсах в минуту на $5 \cdot 10^6$ клеток.

9. Определение внутриклеточного уровня цАМФ и цГМФ в спленоцитах. При определении внутриклеточного уровня циклических нуклеотидов спленоциты преинкубировали в среде 199 в течение 1 ч при 37°C , после чего в культуры (5 млн/мл) вносили ацетат свинца в концентрации 100 мкМ. Реакцию останавливали через 30 и 360 мин. Уровень цАМФ и цГМФ в этаноловых экстрактах определяли радиоконкурентным методом с использованием наборов фирмы «Amersham» (Англия) и выражали в пкмоль на 10^7 клеток.

10. Определение внутриклеточного уровня простагландинов в спленоцитах. Эксперименты проводили по той же схеме, что и при определении циклических нуклеотидов. Экстракцию простагландинов из спленоцитов осуществляли этилацетатом [178]. Уровень простагландинов группы E определяли с использованием наборов фирмы «Clinical Assays» (США), а простагландина $F_{2\alpha}$ — «Izotop» (Венгрия) и выражали в пкг на 10^7 клеток.

2.3. ИССЛЕДОВАНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В СПЛЕНОЦИТАХ КРЫС ПРИ СВИНЦОВОМ ОТРАВЛЕНИИ

В опытах использовали крыс-самцов линии Wistar массой 180–220 г, находящихся на обычном рационе питания.

В первой серии опытов крысам вводили внутрибрюшинно ацетат свинца в дозе 5 мг Pb^{2+} /кг ежедневно в течение 20 суток. Исследование интенсивности синтеза ДНК, РНК и белка в спленоцитах крыс проводилось на 5, 10 и 20-е сутки после начала введения ацетата свинца.

В другой серии опытов крысам вводили внутрибрюшинно ацетат свинца в дозе 25 мг Pb^{2+} /кг ежедневно в течение 3-х суток, после чего одну часть животных забивали, а другую — содержали на обычном рационе вивария в течение 18 суток восстановительного периода. Исследование интенсивности синтеза ДНК, РНК и белка в спленоцитах проводили на 3-и и 21-е сутки после начала введения ацетата свинца.

Контрольной группой в обеих сериях опытов служили крысы, находившиеся на обычном рационе вивария, которым внутрибрюшинно вводили соответствующий объем дистиллированной воды.

В каждом эксперименте популяции свежеизолированных нефракционированных спленоцитов получали от 4-х опытных и 4-х контрольных животных. Клеточные популяции разводили средой 199 + 15 мМ буфера Нерес (рН 7,8) до концентрации $5 \cdot 10^6$ клеток на 1 мл и культивировали в стандартных флаконах при температуре 37 °С в течение 4-х ч.

Включение радиоактивных предшественников в ДНК, РНК и белки спленоцитов крыс определяли по схемам, описанным выше.

2.4. ХИМИКО-АНАЛИТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

1. Определение содержания восстановленного глутатиона. Содержание восстановленного глутатиона в нефракционированных спленоцитах крыс определяли модифицированным методом Кау и Murfitt [154]. Концентрацию восстановленного глутатиона выражали в мкМ на 10^6 клеток.

2. Определение содержания малонового диальдегида. Для определения содержания малонового диальдегида в спленоцитах крыс использовали метод М.С. Гончаренко и А.И. Латиновой [15]. Концентрацию малонового диальдегида выражали в мкМ на 10^6 клеток.

3. Активность глутатионредуктазы (КФ 1.6.4.2 НАДН·Н: глутатион-оксиредуктаза) в спленоцитах крыс исследовали модифицированным методом Wendell [236]. Активность выражали в мкМ НАДФ·Н/ч $\cdot 10^6$ клеток.

2.5. СПЕКТРАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И МАТЕМАТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА ДАННЫХ

Эта серия экспериментов проводилась на базе отдела автоматических спектральных исследований Института физики НАН Республики Беларусь.

Количественное определение ионов свинца в спленоцитах проводилось на атомно-абсорбционном спектрофотометре AAS-1 (Германия) при длине волны регистрации 286,3 нм.

Полученные экспериментальные данные обработаны статистически с использованием программы «Epistat» (Microsoft, США).

Детали данных исследований будут описаны в соответствующих главах.

2.6. ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ РЕАКТИВЫ И ПРЕПАРАТЫ

В работе использовали следующие реактивы: N-гидроксилэтилперазин-2-этансульфоновая кислота (Hepes) — «Sigma» (США); актиномицин Д — «Calbiochem» (США); меркаптоэтанол — «Eastman Kodak» (США); хлорпромазин — «Ciba» (США); SDS-додецилсульфат натрия — «Serva» (ФРГ); ³H-тимидин, ³H-уридин — В/О «Изотоп» (СССР); ¹⁴C-гидролизат белков хлореллы — «UVVVR» (ЧССР); трис, глутатион восстановленный, глутатион окисленный, никотинамид-аденин-динуклеотид-фосфат восстановленный (НАДФН), тиобарбитуровая кислота (ТБК) — «Reanal» (Венгрия); бескальциевая среда Joklik — «Flow» (США, modified of MEM). Остальные препараты и реактивы (квалификации хч) отечественного производства.

Глава 3

СОСТОЯНИЕ МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В Pb^{2+} -ОБРАБОТАННЫХ СПЛЕНОЦИТАХ И ПРИ СВИНЦОВОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

В середине 70-х гг. прошлого столетия было убедительно доказано, что при свинцовой интоксикации животных наблюдается накопление ионов свинца в ядрах клеток [205]. Эти данные представляют определенный интерес с точки зрения возможности непосредственного взаимодействия ионов свинца с основными макромолекулами ядра — ДНК и РНК. Действительно, в ряде лабораторий было установлено в модельных системах, что ионы свинца оказывают существенное влияние на структуру ДНК и РНК [137, 201].

Ионы свинца, как и ионы других металлов (Mg^{2+} , Mn^{2+} и др.), стабилизируют вторичную структуру ДНК [42, 157, 165]. Следует отметить, что взаимодействие ионов свинца с ДНК имеет более выраженный характер, чем с другими ионами металлов [152, 221–223, 239]. Эффект стабилизации связан с образованием компактной структуры макромолекулы ДНК при формировании электростатического комплекса ионов свинца с ДНК. Ионы свинца могут участвовать в формировании внутри- и межцепочечных взаимодействий, что вызывает увеличение жесткости молекулы ДНК. Формирование комплекса имеет стабилизирующий эффект благодаря взаимодействию ионов свинца с фосфатными группами, а также прямому взаимодействию иона с донорными атомами оснований [130, 221]. Прямое взаимодействие ионов свинца с основаниями нуклеиновых кислот вызывает значительные изменения в структуре молекулы ДНК [220]. Формирование компактной структуры макромолекулы ДНК в конечном счете приводит к преципитации комплекса нуклеиновой кислоты с Pb^{2+} . В аналогичных опытах под влиянием таких ионов металлов, как Mg^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} не было обнаружено значительных изменений структуры ДНК [152, 157, 165, 192, 221, 238–240]. Эти данные убедительно говорят о том, что взаимодействие ионов свинца с ДНК высокоспецифично и может играть важную роль в организации структуры ДНК. Существенно отметить, что аналогичное взаимодействие ионов свинца с донорными атомами оснований приводит также к образованию комплексов Pb^{2+} -РНК [91, 204]. В модельных исследованиях синтеза РНК установлено, что такие ионы металлов, как Pb^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Be^{2+} , обладающие мутагенным и канцерогенным эффектами воздействия, изменяют скорость транскрипции РНК [185]. По

степени ингибирования общей транскрипции РНК эти металлы можно расположить в следующий ионный ряд: $Pb^{2+} > Be^{2+} > Cd^{2+} > Co^{2+}$. Полученный эффект ингибирования скорости общей транскрипции РНК различными ионами металлов в разной степени можно частично объяснить степенью «сродства» ионов этих металлов к основаниям нуклеиновых кислот, что отражает другой ионный ряд: $Pb^{2+} > Cd^{2+} > Cu^{2+} > Zn^{2+} > Mn^{2+} > Mg^{2+} > Li^+, K^+, Na^+$ [148].

Интересно отметить тот факт, что ионы свинца в концентрациях, ингибирующих общую скорость транскрипции, увеличивают скорость инициации цепи РНК [185].

Несмотря на интересные сообщения о взаимодействии ионов свинца с макромолекулами, в литературе имеются немногочисленные и противоречивые сведения о влиянии ионов свинца на биосинтез ДНК, РНК и белка. Так, в лейкоцитах и клетках HeLa под влиянием соединений свинца наблюдается ингибирование синтеза ДНК и белка [242], а в клетках печени, почек и легких, наоборот, стимуляция макромолекулярных биосинтезов [100, 146].

Учитывая вышеизложенные факты о взаимодействии ионов свинца с макромолекулами и о влиянии их на макромолекулярные биосинтетические процессы, представлялось интересным оценить интенсивность биосинтеза ДНК, РНК и белка в Pb^{2+} -обработанных спленоцитах и при свинцовой интоксикации.

3.1. ВЛИЯНИЕ АЦЕТАТА СВИНЦА НА СИНТЕЗ ДНК В СПЛЕНОЦИТАХ КРЫС

Согласно химико-биологической классификации ядов, соединения свинца относятся к ядам небиологической природы. Прежде чем перейти к непосредственному изложению собственных экспериментальных данных о влиянии различных концентраций ацетата свинца на макромолекулярные биосинтетические процессы, на наш взгляд, представляется целесообразным дать краткую современную характеристику понятию «токсичность». Существуют различные подходы к определению этого понятия в зависимости от аспекта рассматриваемой проблемы: химического, биологического, физиологического, биохимического, патологического, клинического, фармакологического, экологического, судебно-медицинского и т. д. [12]. Использование любого из перечисленных подходов дает правильное, но неполное определение понятия «токсичность». Нам представ-

ляется наиболее адекватным в настоящей работе использовать химический и биохимический аспекты проблемы взаимодействия ионов свинца с иммунокомпетентными клетками. В химическом аспекте под токсичностью следует понимать способность ионов свинца вызывать нарушения в результате взаимодействия с макромолекулами биологических систем. В биохимическом аспекте под токсичностью следует понимать результат вмешательства ионов свинца как ксенобиотиков в течение биохимических реакций, приводящих к нарушениям процессов жизнедеятельности. Нам казалось возможным использовать учение о клеточном гомеостазе в качестве общей концепции химической патологии. Общеизвестно, что гомеостатические механизмы чрезвычайно многообразны и представлены на самых различных уровнях регуляции: от молекулярного до популяционного. В качестве теста нарушения клеточного гомеостаза на молекулярном уровне мы использовали экспериментальные данные по включению радиоактивных предшественников в ДНК, РНК и белок спленоцитов крыс.

На первом этапе этого раздела работы было проведено исследование влияния ацетата свинца на кинетику включения ^3H -тимидина в ДНК спленоцитов крыс.

На рисунке 3.1 представлены данные о кинетике включения ^3H -тимидина в ДНК интактных спленоцитов крыс и спленоцитов, культивируемых в присутствии ацетата свинца в концентрации 1 мкМ.

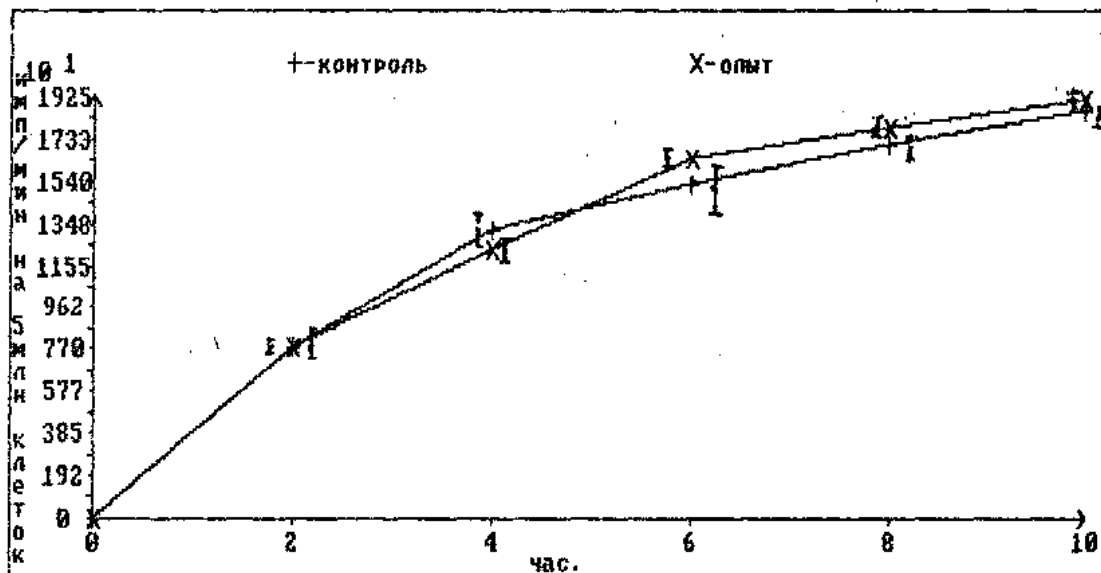


Рис. 3.1. Кинетика включения ^3H -тимидина в ДНК интактных и Pb^{2+} -обработанных (1 мкМ) спленоцитов крыс

Свежеизолированные спленоциты (5 млн клеток на 1 мл культуры) инкубировали в среде 199. Такое же количество спленоцитов параллельно инкубировали с добавлением 1 мкМ ацетата свинца. В культуры вносили ³H-тимидин (5 мкКи/мл) на весь период культивирования. Синтез прерывали через 2, 4, 6, 8 и 10 ч после начала инкубации (см. главу 2). Нерастворимую фракцию собирали на мембранных фильтрах (Millipore, Англия) и определяли радиоактивность на жидкостном сцинтилляционном счетчике «Beckman» (США). На горизонтальной оси — время культивирования спленоцитов (час); на вертикальной — количественные данные о включении ³H-тимидина в ДНК, выраженные в импульсах в минуту на $5 \cdot 10^6$ клеток. Здесь и далее количественные данные о включении радиоактивных предшественников в ДНК, РНК и белок спленоцитов представляют собой среднее арифметическое измерений в 4–6 параллельных культурах и представлены как $M \pm m$.

* — $P < 0,05$ по сравнению с контролем.

Выбор данной концентрации ионов свинца в среде культивирования обусловлен тем, что такая же концентрация ионов свинца в крови у людей может вызывать некоторые ответные реакции, но без симптомов интоксикации свинцом [212].

Сравнительный анализ кинетики включения ³H-тимидина в ДНК интактных и Pb²⁺-обработанных спленоцитов свидетельствует о том, что ионы свинца в концентрации 1 мкМ не оказывают существенного влияния на количество радиоактивного предшественника, включенного в ДНК клеток. Исходя из представлений о биохимическом аспекте понятия «токсичность», следует полагать, что нормальные процессы клеточного гомеостаза не изменяются под влиянием ацетата свинца в концентрации 1 мкМ. Необходимо оговорить, что такая концентрация является нетоксичной только по отношению к данной биологической мишени, т. е. к спленоцитам крыс.

Учитывая приведенные выше результаты, на следующем этапе работы мы считали необходимым изучить влияние ацетата свинца в более высоких концентрациях на кинетику включения ³H-тимидина в ДНК спленоцитов.

На рисунке 3.2 представлены данные о кинетике включения ³H-тимидина в ДНК интактных спленоцитов крыс и спленоцитов, культивируемых в присутствии ацетата свинца в концентрации 10 мкМ.

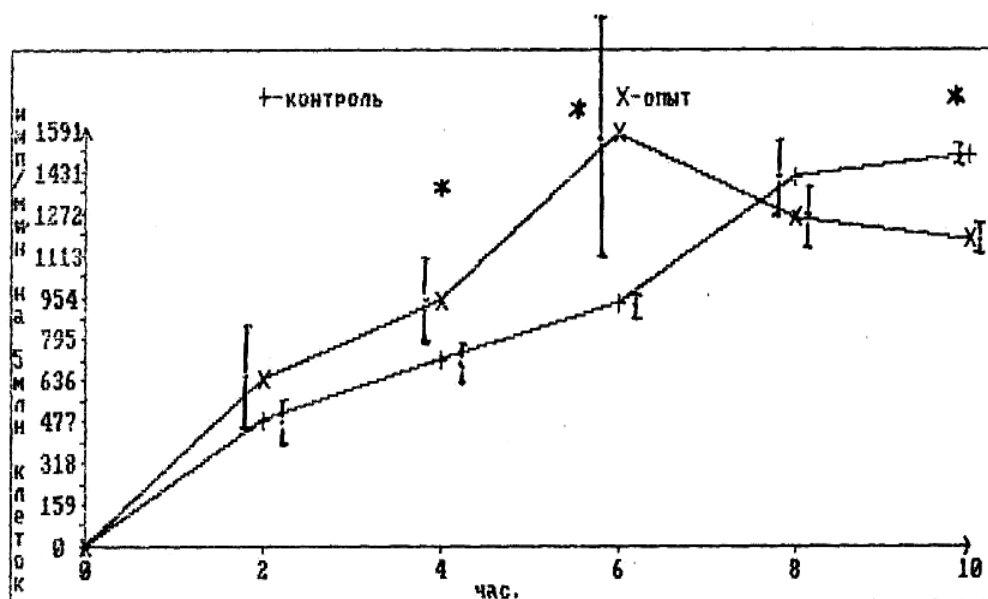


Рис. 3.2. Кинетика включения ^3H -тимидина в ДНК интактных и Pb^{2+} -обработанных (10 мкМ) спленоцитов крыс

Контролем служила популяция свежееизолированных спленоцитов ($5 \cdot 10^6$ клеток на 1 мл культуры), культивируемых в среде 199. В опытные культуры добавляли 10 мкМ ацетата свинца. В культуры клеток вносили ^3H -тимидин (5 мкКи/мл) на весь период культивирования. Количество включенного ^3H -тимидина в ДНК спленоцитов оценивали по радиоактивности кислотоосаждаемого материала (см. главу 2). Ось абсцисс — время инкубации спленоцитов (час); ось ординат — количество включенного ^3H -тимидина в ДНК в импульсах в минуту на $5 \cdot 10^6$ клеток.

Анализ кинетических кривых показывает, что к 4–6-му ч культивирования клеток наблюдается достоверное увеличение включения ^3H -тимидина в ДНК Pb^{2+} -обработанных спленоцитов по сравнению с интактными клетками, причем более выраженный эффект наблюдается к 6-му ч. Последующее культивирование нивелирует этот эффект, и к 10-му ч культивирования клеток с ацетатом свинца наблюдается достоверное уменьшение включения радиоактивного предшественника в ДНК Pb^{2+} -обработанных спленоцитов по сравнению с интактными.

Приведенные результаты экспериментальных исследований указывают на необходимость проведения именно кинетических исследований при оценке влияния соединений свинца на интенсивность включения радиоактивных предшественников в ДНК, РНК и белок спленоцитов крыс. В противном случае, можно получить в зависимости от длительности куль-

тивирования клеток либо увеличение, либо снижение включения радиоактивной метки или вообще отсутствие влияния ацетата свинца на интенсивность макромолекулярных биосинтетических процессов в спленоцитах крыс. В этой связи важно отметить, что время наступления эффекта увеличения или уменьшения включения радиоактивных предшественников в новосинтезированные ДНК, РНК и белок спленоцитов крыс под влиянием ацетата свинца варьирует в различных опытах. Вероятно, время наступления определенного эффекта (увеличения или снижения включения радиоактивной метки в новосинтезированные макромолекулы) зависит не только от концентрации и длительности культивирования ацетата свинца с клетками, но и от состава клеточной популяции, исходного метаболического состояния клеток, проницаемости их мембран и т. д. [4].

Культивирование спленоцитов с ацетатом свинца в концентрации 100 мкМ приводит к аналогичному двухфазному характеру изменений включения радиоактивной метки в ДНК клеток (рис. 3.3). Следует отметить, что наблюдаемое увеличение и последующее снижение включения ^3H -тимидина в ДНК под влиянием ацетата свинца в концентрации 100 мкМ происходит на более ранних этапах культивирования спленоцитов, а именно: увеличение — на 2-м ч, а снижение — на 4-м ч.

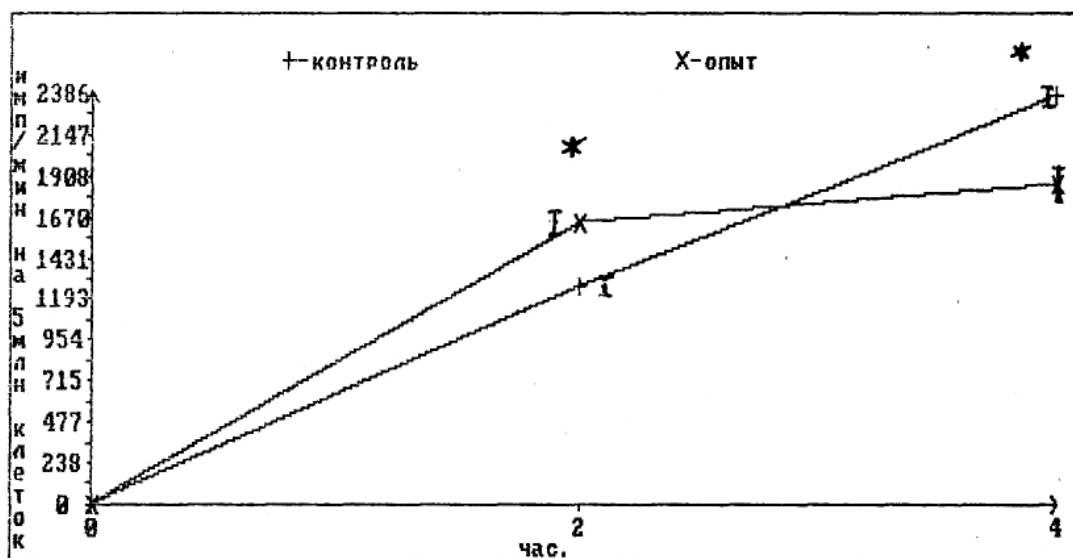


Рис. 3.3. Кинетика включения ^3H -тимидина в ДНК интактных и Pb^{2+} -обработанных (100 мкМ) спленоцитов крыс

Свежеизолированные спленоциты ($5 \cdot 10^6$ клеток на 1 мл культуры) инкубировали в среде 199. Такое же количество спленоцитов параллельно инкубировали с добавлением 100 мкМ ацетата свинца. В культуры вноси-

ли ^3H -тимидин (5 мкКи/мл) на весь период культивирования. Количество включенного ^3H -тимидина в ДНК спленоцитов оценивали по радиоактивности кислотоосаждаемого материала (см. главу 2). Ось абсцисс — время инкубации спленоцитов (час); ось ординат — количество включенного ^3H -тимидина в ДНК в импульсах в минуту $5 \cdot 10^6$ клеток.

Отсутствие существенных изменений в кинетике включения ^3H -тимидина в ДНК спленоцитов, обработанных ацетатом свинца в концентрации 1 мкМ, по-видимому, является свидетельством противостояния этому токсическому агенту клеточных гомеостатических систем. Вероятно, пока интенсивность токсического воздействия не превышает некоторого критического уровня, клеточные гомеостатические механизмы способны обеспечить восстановление нормальных процессов клеточного гомеостаза. Подтверждение этому — данные о том, что даже прочное связывание мембраной эритроцитов ионов свинца до определенного критического уровня не ведет к увеличению выхода из них калия [53]. Несомненно, интенсивность токсического воздействия при использовании в среде культивирования спленоцитов ацетата свинца в концентрациях 10 мкМ, а тем более 100 мкМ превышает определенный критический уровень, приводящий к нарушению клеточных гомеостатических механизмов, что находит свое отражение в характерном изменении кинетики включения ^3H -тимидина в ДНК Pb^{2+} -обработанных спленоцитов.

Анализируя полученные нами данные об увеличении включения ^3H -тимидина в ДНК спленоцитов под влиянием ионов свинца, следует иметь в виду, что количество новосинтезированной ДНК в клетках определяется не только скоростью её синтеза, но и равновесием этого процесса со скоростью распада, зависящей от стабильности новосинтезированных молекул ДНК и активности нуклеаз. Поэтому обнаруженное нами увеличение включения ^3H -тимидина в ДНК на начальных этапах культивирования клеток с ацетатом свинца, с одной стороны, может быть обусловлено стимуляцией синтеза ДНК. С другой стороны, учитывая литературные данные о стабилизирующем действии ионов свинца на структуру макромолекулы ДНК, трудно исключить возможность накопления в спленоцитах, обработанных ацетатом свинца, более устойчивых к распаду новосинтезированных молекул ДНК, что в конечном итоге и может привести к увеличению количества радиоактивного предшественника в новосинтезированной ДНК по сравнению с таковым в интактных клетках.

Следует подчеркнуть, что снижение включения ^3H -тимидина в ДНК спленоцитов под влиянием ионов свинца также может быть обусловлено как угнетением синтеза ДНК, так и увеличением скорости распада ново-синтезированной ДНК.

Исходя из общих представлений о механизмах токсического действия, о том, что для химической патологии характерным является такая последовательность событий, при которой специфическое действие предшествует общим эффектам и имеет значение пускового механизма [13], можно предположить, что увеличение включения ^3H -тимидина в новосинтезированную ДНК спленоцитов является проявлением одной из сторон специфического действия ионов свинца на спленоциты. В то же время, обнаруженное нами снижение включения радиоактивного предшественника в ДНК спленоцитов под влиянием ионов свинца на более поздних этапах культивирования клеток может быть отражением неспецифических эффектов токсического действия ионов свинца на молекулярном уровне.

3.2. ВЛИЯНИЕ АЦЕТАТА СВИНЦА НА СИНТЕЗ РНК В СПЛЕНОЦИТАХ КРЫС

Учитывая приведенные ранее литературные данные о влиянии ионов свинца на макроструктуру РНК и об увеличении скорости инициации цепи РНК ионами свинца в концентрациях, ингибирующих общую скорость транскрипции РНК [185], нам представлялось целесообразным на данном этапе исследований изучить влияние ионов свинца на кинетику включения ^3H -уридина в РНК спленоцитов крыс.

На рисунке 3.4 представлены данные о кинетике включения ^3H -уридина в РНК интактных спленоцитов и спленоцитов, культивируемых в присутствии ацетата свинца в концентрации 10 мкМ. Сравнительный анализ кинетики включения ^3H -уридина в РНК интактных и Pb^{2+} -обработанных спленоцитов показывает, что к 4-му ч культивирования клеток наблюдается достоверное увеличение включения ^3H -уридина в РНК спленоцитов под влиянием ацетата свинца. Последующее культивирование, как и в случае с включением ^3H -тимидина, нивелирует этот эффект, и к 8-му ч культивирования клеток наблюдается достоверное снижение включения радиоактивного предшественника в РНК Pb^{2+} -обработанных спленоцитов по сравнению с интактными.

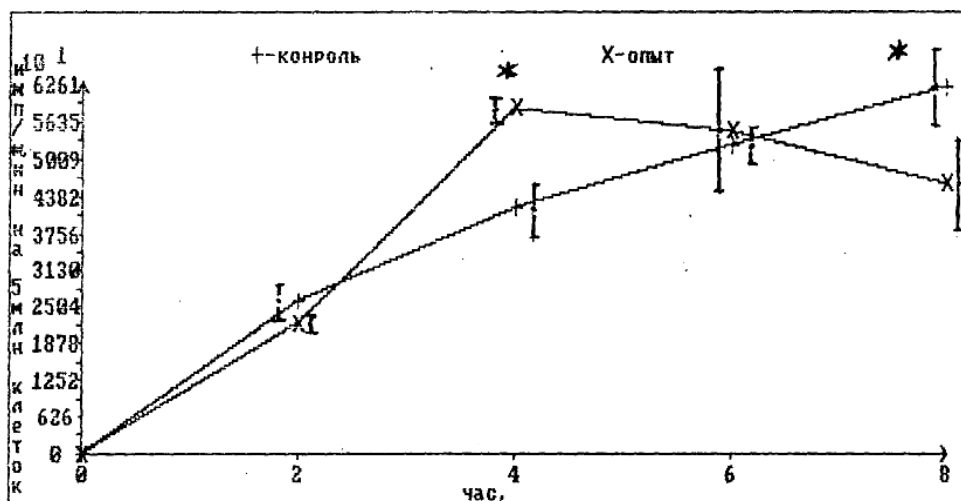


Рис. 3.4. Кинетика включения ^3H -уридина в РНК интактных и Pb^{2+} -обработанных (10 мкМ) спленоцитов крыс

Контролем являлась популяция свежеизолированных спленоцитов ($5 \cdot 10^6$ клеток на 1 мл культуры), культивируемых в среде 199. В культуры опытных спленоцитов добавляли 10 мкМ ацетата свинца. В культуры вносили ^3H -уридин (5 мКи /мл) на весь период культивирования. Синтез РНК прерывали через 2, 4, 6 и 8 ч инкубации (см. главу 2). Кислоосаждаемую фракцию собирали на мембранных фильтрах (Millipore, Англия) и определяли радиоактивность на жидкостном сцинтилляционном счетчике «Вескман» (США). На горизонтальной оси — время культивирования спленоцитов (час); на вертикальной оси — количество включенного ^3H -уридина в РНК в импульсах в минуту на $5 \cdot 10^6$ клеток.

Культивирование спленоцитов с ацетатом свинца в концентрации 100 мкМ приводит к аналогичному двухфазному характеру изменений включения радиоактивной метки в РНК клеток (рис. 3.5).

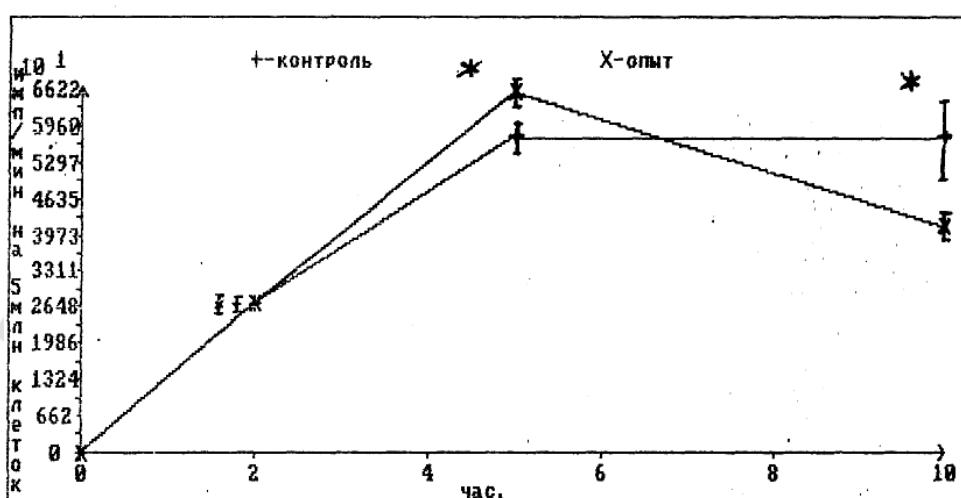


Рис. 3.5. Кинетика включения ^3H -уридина в РНК интактных и Pb^{2+} -обработанных (100 мкМ) спленоцитов крыс

Свежеизолированные спленоциты ($5 \cdot 10^6$ клеток на 1 мл культуры) инкубировали в среде 199. Такое же количество спленоцитов параллельно инкубировали с добавлением 100 мкМ ацетата свинца. В культуры вносили ^3H -уридин (5 мкКи/мл) на весь период культивирования. Количество включенного ^3H -уридина в РНК оценивали по радиоактивности кислотоосаждаемого материала (см. главу 2). Ось абсцисс — время культивирования спленоцитов (час); ось ординат — количество включенного ^3H -уридина в РНК в импульсах в минуту на $5 \cdot 10^6$ клеток.

Обращает на себя внимание факт полного совпадения характера изменений включения радиоактивных предшественников в ДНК и РНК спленоцитов крыс под влиянием ацетата свинца. На первый взгляд, это может быть отражением общности механизмов, обеспечивающих изменения включения радиоактивных предшественников в ДНК и РНК. Вместе с тем, следует иметь в виду, что ДНК и РНК ни в коем случае не ведут себя сходным образом во всех реакциях с ионами металлов. Например, существует реакция, которая протекает исключительно с РНК, но не идет с ДНК, — это деполимеризация полинуклеотида вследствие расщепления фосфодиэфирных связей [42]. Так, использование $\text{Pb}(\text{OH})_2$ для разрушения РНК приводит преимущественно к образованию нуклеозидов. Ионы свинца имитируют ферменты в проявлении специфичности по отношению к реакции расщепления полинуклеотидов; $\text{Pb}(\text{II})$, например, разрушает гомополинуклеотиды в таком порядке: поли-А > поли-У > поли-И > поли-Ц [122]. Особо следует отметить, что ионы свинца разрушают РНК быстрее, чем любой другой из изученных ионов металлов [122].

Поскольку количество новосинтезированной РНК, как и ДНК, в клетках зависит не только от скорости синтеза, но и от равновесия этого процесса со скоростью распада и стабильностью новосинтезированных молекул РНК, то наблюдаемое на начальном этапе культивирования клеток увеличение включения ^3H -уридина в РНК Pb^{2+} -обработанных спленоцитов по сравнению с интактными клетками может быть обусловлено как стимуляцией синтеза РНК, так и уменьшением скорости распада новосинтезированной РНК в результате стабилизирующего эффекта ионов свинца на структуру макромолекулы [91, 204] и (или) угнетения активности рибонуклеаз [14, 54].

Снижение включения ^3H -уридина в РНК спленоцитов при более длительном культивировании с ацетатом свинца (до 10 ч) может быть обусловлено, с одной стороны, угнетением синтеза РНК, а с другой —

увеличением скорости распада новосинтезированной РНК в результате специфичной реакции деполимеризации полинуклеотида под влиянием ионов свинца.

Для проверки приведенных выше предположений о возможных механизмах влияния ацетата свинца на количество включенного ^3H -уридина в РНК спленоцитов крыс были проведены эксперименты по определению РНК-синтетической активности, оцениваемой по включению радиоактивного предшественника в кислотоосаждаемый материал клеток, меченых в течение 15 мин, и стабильности новосинтезированной РНК (см. главу 2). Следует отметить, что в зависимости от времени инкубации клеток с меченым предшественником удается обнаружить либо новосинтезированные предшественники РНК (инкубация 5–30 мин), либо зрелые РНК (инкубация 1–6 ч). Типы РНК, которые метятся за короткое время инкубации, обычно называют «быстрометящимися» — бмРНК [90]. Количество включенного радиоактивного предшественника в короткомеченую РНК является мерой РНК-синтетической активности клеток, так как распад РНК за счет процессинга и выхода в цитоплазму зрелых молекул всех типов РНК ещё не вносит вклад в этот показатель [45,105].

Для изучения стабильности бмРНК в качестве методического приема обычно используют кратковременную инкубацию клеток с ^3H -уридином и последующее выдерживание их в присутствии актиномицина Д в концентрации, полностью подавляющей синтез РНК (5–10 мкг/мл).

В литературе отсутствуют какие-либо сведения о влиянии ионов свинца на РНК-синтетическую активность и стабильность бмРНК в иммунокомпетентных клетках. Поэтому было проведено изучение РНК-синтетической активности и стабильности суммарных бмРНК в спленоцитах крыс, пульс-меченых в течение 15 мин и чейз-инкубированных в течение 9 ч. Пульс-чейз-эксперименты проводили на свежеизолированных интактных спленоцитах и спленоцитах, предварительно обработанных ацетатом свинца в концентрации 10 мкМ в течение 1 ч. Чейз-эксперимент проводили с использованием актиномицина Д (10 мкг/мл). Полученные данные представлены в таблице 3.1.

При анализе данных по включению ^3H -уридина в кислотоосаждаемый материал спленоцитов крыс, пульс-меченых в течение 15 мин, видно, что интенсивность синтеза бмРНК в Pb^{2+} -обработанных спленоцитах не отличается от таковой в интактных клетках. Поскольку актиномицин Д немедленно вызывает высокоэффективный чейз, то разрушения суммар-

ной бмРНК следует ожидать, фактически, от нулевого времени после добавления актиномицина Д [80].

Таблица 3.1

Влияние ацетата свинца на включение ^3H -уридина (имп/мин) в бмРНК и их стабильность в спленоцитах крыс

Продолжительность актиномицинового блока, час	Условия	
	Контроль	Клетки+Pb(CH ₃ COO) ₂ 10 мкМ
0	12144 ± 585 (4)	13436 ± 670 (4)
1	4608 ± 176 (4)	4753 ± 115 (4)
3	3522 ± 143 (4)	4914 ± 169* (4)
9	2849 ± 126 (4)	3135 ± 151 (4)

Примечание: здесь и далее в скобках указано число опытов; различные исходные величины связаны с тем, что спленоциты получены от разных животных. * — Различия по сравнению с контролем достоверны ($P < 0,05$).

Действительно, как в интактных, так и в Pb^{2+} -обработанных спленоцитах наблюдается выраженное в равной степени уменьшение количества включенного ^3H -уридина (~ на 60 %) в кислотоосаждаемый материал спленоцитов уже после часового актиномицинового чейза по сравнению с таковым в нулевое время, что, несомненно, является отражением распада лабильного пула новосинтезированных бмРНК. Через 3 ч актиномицинового чейза в интактных спленоцитах наблюдается дальнейшее уменьшение количества включенного ^3H -уридина в кислотоосаждаемый материал клеток, а в Pb^{2+} -обработанных спленоцитах количество включенного радиоактивного предшественника не изменяется через 3 ч актиномицинового блока по сравнению с часовым актиномициновым чейзом. Такой характер изменений приводит к достоверному увеличению количества включенного ^3H -уридина в бмРНК Pb^{2+} -обработанных спленоцитов по сравнению с интактными клетками, обусловленному резким замедлением распада новосинтезированной бмРНК в Pb^{2+} -обработанных спленоцитах. При продолжительности актиномицинового чейза в течение 9 ч наблюдается достоверное уменьшение количества включенного ^3H -уридина в бмРНК как интактных, так и Pb^{2+} -обработанных спленоцитов. Однако если в интактных спленоцитах снижение количества включенного ^3H -уридина в бмРНК происходит на 19 %, то в Pb^{2+} -обработанных клетках — на 37 % по

отношению к 3-часовому чейзу, что свидетельствует о двухкратном увеличении интенсивности распада бмРНК в Pb^{2+} -обработанных спленоцитах по сравнению с интактными клетками. Этот эффект, вероятно, обусловлен РНК-деполимеризующим действием ионов свинца.

Полученные экспериментальные данные позволяют сделать следующие выводы: ионы свинца не оказывают влияния на РНК-синтетическую активность спленоцитов; новосинтезированные бмРНК представляют собой относительно лабильный пул, подвергающийся деградации ~ на 60 % уже после часового актиномицинового чейза; достоверное увеличение количества включенного 3H -уридина в бмРНК Pb^{2+} -обработанных спленоцитов к 3-му ч актиномицинового блока обусловлено стабилизирующим действием ионов свинца на структуру РНК и (или) угнетением ими активности рибонуклеаз и, как следствие, меньшей интенсивностью распада; двухкратное усиление интенсивности распада бмРНК в Pb^{2+} -обработанных спленоцитах по сравнению с контролем, вероятно, обусловлено депполимеризующим влиянием ионов свинца на структуру РНК при более длительном (до 10 ч) культивировании клеток.

Прежде чем перейти к рассмотрению данных по метаболизму РНК в интактных и Pb^{2+} -обработанных спленоцитах, кратко остановимся на современных представлениях относительно синтеза, процессинга и распада разных типов РНК в эукариотических клетках.

Основную часть РНК клетки (~ 80 %) составляют рРНК, которые способствуют связыванию между собой мРНК и тРНК и являются скелетным элементом для многих рибосомальных белков [70].

Гены рРНК присутствуют в ядрышке в виде большого числа копий и имеют высокий процент ГЦ-нуклеотидов. Эта особенность нуклеотидного состава позволяет использовать актиномицин Д в низких концентрациях (0,05–0,5 мкг/мл) для селективного подавления синтеза рРНК.

За исключением 5S рРНК, все зрелые рРНК (28S, 18S и 5,8S) образуются из макромолекулярного предшественника — 45S пре-рРНК [16]. Синтез 45S пре-рРНК осуществляется в ядрышке ДНК-зависимой РНК-полимеразой I. В результате многостадийного процессинга около 60 % молекулы 45S пре-рРНК «вырезается» специфическими эндонуклеазами и превращается в зрелые рРНК; остальные 40 % распадаются в ядрышке [235].

Около 15 % всех клеточных РНК составляют тРНК, которые синтезируются в виде первичных транскриптов — 6,5S пре-тРНК [119]. Синтез

пре-тРНК осуществляется в нуклеоплазме ДНК-зависимой РНК-полимеразой III. Более подробно вопросы, касающиеся биосинтеза тРНК, освещены в обзоре [8].

Третий тип РНК — мРНК — составляет 3–5 % от тотальной РНК клеток [213]. Предшественниками мРНК цитоплазмы являются гигантские молекулы РНК различной молекулярной массы (гетерогенная ядерная РНК) — гяРНК, составляющие не более 1 % от тотальной клеточной РНК [55]. ГяРНК синтезируются на хроматине с помощью ДНК-зависимой РНК-полимеразы II. Время процессинга гяРНК до зрелых мРНК обычно составляет 15–20 мин [194]. Структура, функция и процессинг гяРНК в эукариотических клетках подробно освещены в обзоре [55].

Кроме высокомолекулярных предшественников стабильных РНК цитоплазмы в ядре содержатся также метаболически стабильные (время полужизни ~ 24 ч) низкомолекулярные РНК (менее 30 нуклеотидов) — нмРНК. Большой материал по структуре и метаболическим свойствам нмРНК можно найти в обзоре [44].

Вопрос соотношения разных типов РНК (гяРНК, 45S пре-рРНК и 6,5S пре-тРНК) среди бмРНК лимфоцитов до настоящего времени окончательно не решен [23].

Для оценки доли 45S пре-рРНК среди бмРНК спленоцитов мы использовали метод селективного ингибирования синтеза рРНК низкими концентрациями актиномицина Д [23]. Для ингибирования синтеза 45S пре-рРНК использовали актиномицин Д в концентрации 0,15 мкг/мл [45].

Для оценки доли актиномицинустойчивой (АМД) фракции в общем пуле бмРНК использовали актиномицин Д в концентрации 10 мкг/мл [217].

Время преинкубации клеток с актиномицином Д составляло 1 ч, так как в течение этого времени достигается максимальное подавление синтеза РНК [195].

Как мы уже отмечали ранее, время наступления эффекта увеличения или уменьшения количества включенных радиоактивных предшественников в новосинтезированные ДНК, РНК и белок спленоцитов крыс под влиянием ацетата свинца варьирует в различных опытах, что зависит, вероятно, от концентрации, длительности культивирования ацетата свинца с клетками, от состава клеточной популяции, исходного метаболического состояния клеток, проницаемости их мембран и т. д. [4]. Учитывая это, при обсуждении изменений метаболизма РНК в спленоцитах под влиянием ацетата свинца будем полагать, что они лежат вне определенного вре-

менного диапазона. Иными словами, особенности изменений метаболизма РНК в спленоцитах под влиянием ацетата свинца будут рассмотрены по отношению к конкретному эффекту увеличения или уменьшения включения ^3H -уридина в РНК вне зависимости от времени его наступления.

В таблице 3.2 представлены некоторые показатели метаболизма РНК в интактных спленоцитах, а также спленоцитах, культивируемых в присутствии различных концентраций ацетата свинца, на стадии повышенного включения ^3H -уридина в тотальную клеточную РНК. Обращает на себя внимание факт полного совпадения характера изменений изученных показателей метаболизма РНК в спленоцитах под влиянием разных концентраций ацетата свинца, не считая того, что в культурах клеток, обработанных более высокой концентрацией, эти изменения наступают гораздо раньше.

Таблица 3.2

Влияние различных концентраций ацетата свинца на некоторые показатели метаболизма РНК (имп/мин на $5 \cdot 10^6$ клеток) на стадии увеличения включения ^3H -уридина в тотальную клеточную РНК Pb^{2+} -обработанных спленоцитов крыс

Условия	Тотальная клеточная РНК	бмРНК	45S пре-рРНК	гяРНК + пре-тРНК + АМД-устойчивая РНК
Интактные клетки (5 млн/мл)	6083 ± 219 (4)	548 ± 39 (6)	290 ± 23 (6)	294 ± 17 (6)
Клетки (5 млн/мл) + $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 100 мкМ	7909 ± 437* (4)	605 ± 46 (6)	254 ± 23* (6)	351 ± 24* (6)
Интактные клетки (5 млн/мл)	10350 ± 881 (4)	784 ± 54 (4)	420 ± 36 (4)	364 ± 20 (4)
Клетки (5 млн/мл) + $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 10 мкМ	14075 ± 679* (4)	777 ± 55 (4)	350 ± 31* (4)	452 ± 26* (4)

При анализе данных по включению ^3H -уридина в кислотоосаждаемый материал спленоцитов пульс-меченых в течение 15 мин (быстрометящиеся РНК — бмРНК) видно, что интенсивность синтеза тотальной бмРНК в Pb^{2+} -обработанных спленоцитах не отличается от таковой в интактных спленоцитах.

Результаты селективного ингибирования синтеза 45S пре-рРНК в интактных спленоцитах с использованием актиномицина Д (0,15 мкг/мл) свидетельствуют о том, что доля 45S пре-рРНК составляет около 50 % от общего пула бмРНК. Имеются сведения, что в иммунокомпетентных клетках среди бмРНК преимущественно синтезируется гетерогенная ядерная РНК — гяРНК (до 90 % от бмРНК) [228]. Приведенные нами дан-

ные о синтезе 45S пре-рРНК в интактных спленоцитах ставят под сомнение представление о преимущественном синтезе гяРНК среди бмРНК в иммунокомпетентных клетках.

В спленоцитах, преинкубированных с ацетатом свинца в течение времени, необходимого для увеличения количества включенного ^3H -уридина в тотальную клеточную РНК, обнаружены разнонаправленные изменения синтеза различных типов бмРНК. Так, синтез 45S пре-рРНК достоверно угнетен, а синтез суммарного пула гяРНК + пре-тРНК + актиномицинустойчивая РНК, наоборот, активирован по сравнению с интактными спленоцитами.

В параллельно проведенных экспериментах с использованием актиномицина Д (10 мкг/мл) установлено, что доля актиномицинустойчивой РНК среди бмРНК в Pb^{2+} -обработанных спленоцитах не изменена по сравнению с таковой в интактных спленоцитах и составляет $\sim 7\%$. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что одной из причин повышенного включения ^3H -уридина в тотальную клеточную РНК под влиянием ацетата свинца может быть активация синтеза гяРНК и (или) пре-тРНК. Важно, однако, иметь в виду, что гяРНК составляет не более 1 % от общей клеточной РНК [55]. Поэтому можно полагать, что увеличение включения ^3H -уридина в тотальную клеточную РНК спленоцитов, обработанных ацетатом свинца, с одной стороны, связано с уменьшением скорости распада новосинтезированной РНК, обусловленным стабилизацией структуры макромолекулы и (или) угнетением активности рибонуклеаз, а с другой стороны, с активацией ионами свинца синтеза и накопления в цитоплазме новосинтезированных тРНК.

Исходя из данных, представленных в таблице 3.3, видно, что в спленоцитах, преинкубированных с ацетатом свинца (100 мкМ) в течение времени, необходимого для уменьшения количества включенного ^3H -уридина в тотальную клеточную РНК, наблюдается угнетение РНК-синтетической активности и синтеза всех типов бмРНК. Эти результаты свидетельствуют в пользу представлений об общетоксическом действии ионов свинца на клетки при длительном культивировании спленоцитов в присутствии ацетата свинца. Иными словами, уменьшение количества включенного ^3H -уридина в РНК может быть связано как с РНК-деполимеризующим действием ионов свинца, так и непосредственно с угнетением синтеза РНК.

Таблица 3.3

Влияние ацетата свинца (100 мкМ) на некоторые показатели метаболизма РНК (имп/мин на $5 \cdot 10^6$ клеток) на стадии уменьшения включения ^3H -уридина в тотальную клеточную РНК Pb^{2+} -обработанных спленоцитов крыс

Показатели	Интактные клетки (5 млн/мл)	Интактные клетки (5 млн/мл) + $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 100 мкМ
Тотальная клеточная РНК	57522 ± 7671 (4)	$41378 \pm 3098^*$ (4)
бмРНК	4085 ± 618 (4)	$1761 \pm 467^*$ (4)
45S пре-рРНК	2601 ± 434 (4)	$688 \pm 231^*$ (4)
гяРНК + пре-тРНК + АМД-устойчивая РНК	1484 ± 199 (4)	$1073 \pm 288^*$ (4)

В таблице 3.4 представлены данные о влиянии актиномицина Д (0,15 мкг/мл) на включение ^3H -уридина в РНК спленоцитов, меченых в течение 4-х ч, времени, достаточного для включения метки во все типы бмРНК, их процессинга и выхода зрелых молекул РНК в цитоплазму.

Таблица 3.4

Влияние актиномицина Д (0,15 мкг/мл) на включение ^3H -уридина в РНК Pb^{2+} -обработанных спленоцитов

Условия	Имп/мин на $5 \cdot 10^6$ клеток
Тотальная РНК:	
Интактные клетки	2536 ± 404
Клетки + $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 100 мкМ	$4073 \pm 1066^*$ (8)
Нерибосомальные РНК:	
Интактные клетки	1678 ± 647
Клетки + $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 100 мкМ	$2658 \pm 981^*$ (8)
рРНК:	
Интактные клетки	858 ± 125
Клетки + $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 100 мкМ	$1414 \pm 149^*$ (8)

При анализе данных по включению ^3H -уридина в РНК спленоцитов видно, что включение радиоактивного предшественника в тотальную клеточную РНК, рРНК и нерибосомальные РНК Pb^{2+} -обработанных спленоцитов достоверно увеличено по сравнению с интактными клетками. Важ-

но отметить, что увеличение количества включенного ^3H -уридина в рРНК Pb^{2+} -обработанных спленоцитов происходит не за счет стимуляции синтеза рРНК, так как на стадии повышенного включения радиоактивной метки в тотальную клеточную РНК спленоцитов под влиянием ацетата свинца наблюдается достоверное угнетение синтеза предшественника рРНК — 45S пре-рРНК (табл. 3.2). Не исключено, что обнаруженное увеличение является результатом накопления стабильных форм рРНК и (или) угнетения активности рибонуклеаз в Pb^{2+} -обработанных спленоцитах. Увеличение включения ^3H -уридина в нерибосомальные РНК Pb^{2+} -обработанных спленоцитов по сравнению с интактными, напротив, может быть обусловлено как накоплением стабильных форм, угнетением рибонуклеаз, так и стимуляцией ионами свинца синтеза нерибосомальных РНК, преимущественно за счет активации синтеза тРНК.

3.3. ВЛИЯНИЕ АЦЕТАТА СВИНЦА НА СИНТЕЗ БЕЛКА В СПЛЕНОЦИТАХ КРЫС

В литературе существуют разноречивые взгляды о влиянии ионов свинца на содержание белка в различных клетках. Имеются сведения, указывающие на достоверное снижение содержания белка в клетках мозга мышей, срезах печени эмбрионов крыс под воздействием ионов свинца [75, 158]. Кроме того, ряд исследователей отмечает торможение синтеза микросомальных белков крыс, хотя синтез белка в ядрах и митохондриях при этом не нарушается [242]. В исследованиях *in vitro* показано, что включение ^{14}C -глицина в глобин эритроцитов уток уменьшается на 25 % концентрацией свинца $5 \cdot 10^{-4}$ М [153]. Вместе с тем, имеются данные о том, что свинец в концентрации 10 мкМ сильно стимулирует синтез белка в клетках почки крысы (включение ^3H -лейцина увеличивалось на 140 %) [146]. Более того, установлено, что ионы свинца в культурах фибробластов крысы и в клетках эпителия почек способны индуцировать образование трех белков, которые представляют собой две различные группы так называемых «стрессовых» белков [208]. Обнаружено также образование лабильных цитоплазматических белков, которые идентифицированы как свинец-связывающие белки. Эти цитоплазматические белки являются первичными связывающими агентами для ионов свинца и могут медирировать транспорт ионов металла в ядро [123]. Goyer и соавт., опираясь на данные своих исследований на крысах, предположили, что внутриядерные клеточные включения, которые развиваются в процессе воздействия

свинца, служат защитным механизмом, связывая свинец в почках и снижая тем самым его токсичность [135], но, по-видимому, лишь в течение ограниченного периода воздействия [106].

Перечисленные факты стимулировали интерес к изучению влияния ацетата свинца на синтез белка в спленоцитах крыс.

На рисунке 3.6 представлены данные о включении ^{14}C -гидролизата белков хлореллы в новосинтезированные белки интактных спленоцитов крыс и спленоцитов, культивируемых в присутствии ацетата свинца в концентрации 10 мкМ. Сравнительный анализ кинетических кривых показывает, что к 8-му ч культивирования клеток наблюдается достоверное увеличение включения радиоактивной метки в белки Pb^{2+} -обработанных спленоцитов по сравнению с интактными клетками.

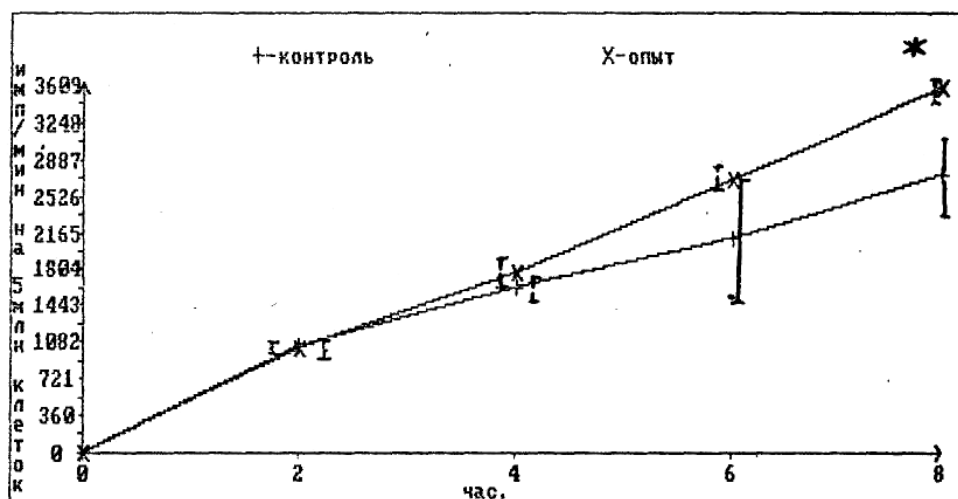


Рис. 3.6. Кинетика включения ^{14}C -гидролизата белков хлореллы в белки интактных и Pb^{2+} -обработанных (10 мкМ) спленоцитов крыс

Контролем являлась популяция свежеизолированных спленоцитов ($5 \cdot 10^6$ клеток на 1 мл культуры), культивируемых в среде 199. В опытные культуры вносили 10 мкМ ацетата свинца. В культуры добавляли ^{14}C -гидролизат белков хлореллы (5 мКи/мл) на весь период культивирования. После окончания инкубации нерастворимую фракцию собирали на мембранных фильтрах (Millipore, Англия) и определяли радиоактивность на жидкостном сцинтилляционном счетчике «Векман» (США). На горизонтальной оси — время культивирования спленоцитов (час); на вертикальной оси — количество включенного ^{14}C -гидролизата в белки в импульсах в минуту на $5 \cdot 10^6$ клеток.

При анализе данных о влиянии ацетата свинца в концентрации 100 мкМ на синтез белка следует отметить, что стадия увеличения вклю-

чения ^{14}C -гидролизата в новосинтезированные белки Pb^{2+} -обработанных спленоцитов по сравнению с контролем наблюдается уже на 2-м ч культивирования клеток (рис. 3.7). Дальнейшее культивирование спленоцитов с ацетатом свинца (100 мкМ) нивелирует этот эффект.

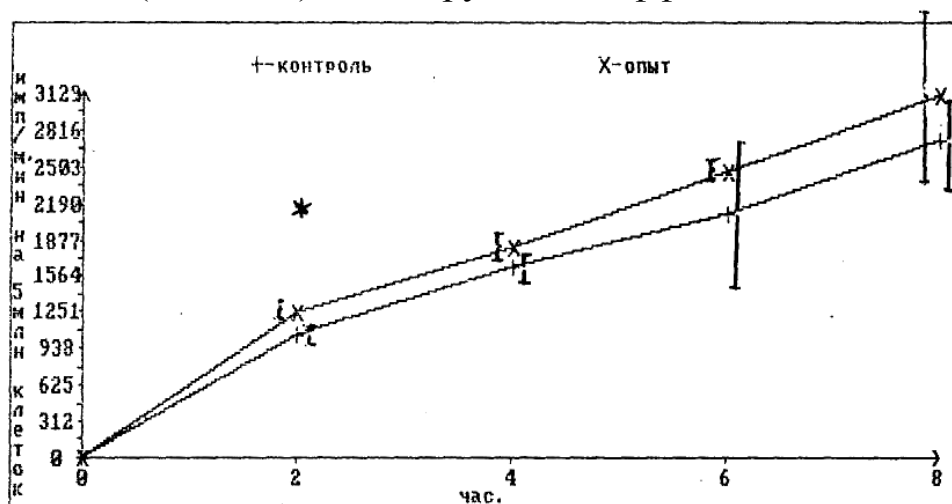


Рис. 3.7. Кинетика включения ^{14}C -гидролизата белков хлореллы в белки интактных и Pb^{2+} -обработанных (100 мкМ) спленоцитов крыс

Свежеизолированные спленоциты ($5 \cdot 10^6$ клеток на 1 мл культуры) инкубировали в среде 199. Такое же количество спленоцитов параллельно инкубировали с добавлением 100 мкМ ацетата свинца. В культуры вносили ^{14}C -гидролизат белков хлореллы (5 мкКи/мл) на весь период культивирования. Синтез прерывали через 2, 4, 6 и 8 ч. Количество включенного радиоактивного предшественника оценивали по радиоактивности кислотоосаждаемого материала (см. главу 2). Ось абсцисс — время культивирования спленоцитов (час); ось ординат — количество включенного ^{14}C -гидролизата в белки в импульсах в минуту на $5 \cdot 10^6$ клеток.

С целью выяснения роли новосинтезированной рРНК в стимуляции синтеза белка в спленоцитах под влиянием ацетата свинца была проведена серия экспериментов с использованием актиномицина Д в концентрации 0,15 мкг/мл, селективно ингибирующей синтез рРНК. Полученные данные представлены в таблице 3.5.

При анализе данных о влиянии актиномицина Д (0,15 мкг/мл) на включение ^{14}C -гидролизата в новосинтезированные белки Pb^{2+} -обработанных спленоцитов обращает на себя внимание тот факт, что увеличение включения радиоактивного предшественника в белки спленоцитов под воздействием ионов свинца не зависит от синтеза рРНК de novo.

Влияние актиномицина Д (0,15 мкг/мл) на включение ¹⁴С-гидролизата белков хлореллы в белки Pb²⁺-обработанных спленоцитов крыс

Условия	Имп/мин на 5·10 ⁶ клеток
Интактные клетки	2037 ± 50
Клетки + Pb(CH ₃ COO) ₂ 100 мкМ	2534 ± 54* (4)
Клетки + 0,15 мкг АД	1251 ± 64
Клетки + Pb(CH ₃ COO) ₂ 100 мкМ + 0,15 мкг АД	2359 ± 178* (4)

**3.4. ВЛИЯНИЕ СВИНЦОВОЙ ИНТОКСИКАЦИИ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ
МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ
В СПЛЕНОЦИТАХ КРЫС**

Полученные экспериментальные данные о влиянии ацетата свинца на синтез ДНК, РНК и белка в спленоцитах крыс *in vitro* стимулировали интерес к изучению влияния ионов свинца на макромолекулярные биосинтетические процессы в спленоцитах крыс при свинцовой интоксикации.

В литературе отсутствуют сведения о характере изменений интенсивности синтеза ДНК, РНК и белка в иммунокомпетентных клетках при свинцовом отравлении. Поэтому значительный интерес представляют данные о содержании ДНК, РНК и белка в других органах и тканях при интоксикации соединениями свинца. Так, через 24 ч после введения ацетата свинца (100 мг/кг), наблюдается торможение синтеза микросомальных белков у крыс [242]. В тимусе крыс Wistar при интоксикации свинцом наблюдается снижение содержания белка и увеличение ДНК. В печени, наоборот, содержание ДНК уменьшается, а белка и РНК увеличивается [131]. При внутрижелудочном введении мышам ацетата свинца в дозе 1–20 мг/100 г в течение 4–16 недель наблюдается в пирамидальных клетках мозга снижение содержания ДНК, РНК и общего белка [75]. При внутрибрюшинном введении ацетата свинца в дозе 2,5–5 мг/кг содержание ДНК и РНК в сердце на 5-й день опыта было значительно выше, чем в контроле, а затем их содержание снижалось до контрольного уровня. Содержание ДНК в мозге было ниже, чем в контроле, а содержание РНК не отличалось от контрольного уровня [94].

Прежде чем перейти к рассмотрению данных об интенсивности синтеза ДНК, РНК и белка в спленоцитах крыс при свинцовой интоксикации,

мы считали целесообразным изучить количественное содержание свинца в спленоцитах в динамике свинцового отравления.

В первой серии экспериментов крысам-самцам Wistar вводили внутрибрюшинно ацетат свинца в дозе $5 \text{ мг Pb}^{2+}/\text{кг}$ ежедневно в течение 20 суток. На рисунке 3.8 представлены данные о содержании свинца в спленоцитах крыс на 5, 10 и 20-е сутки после начала введения ацетата свинца.

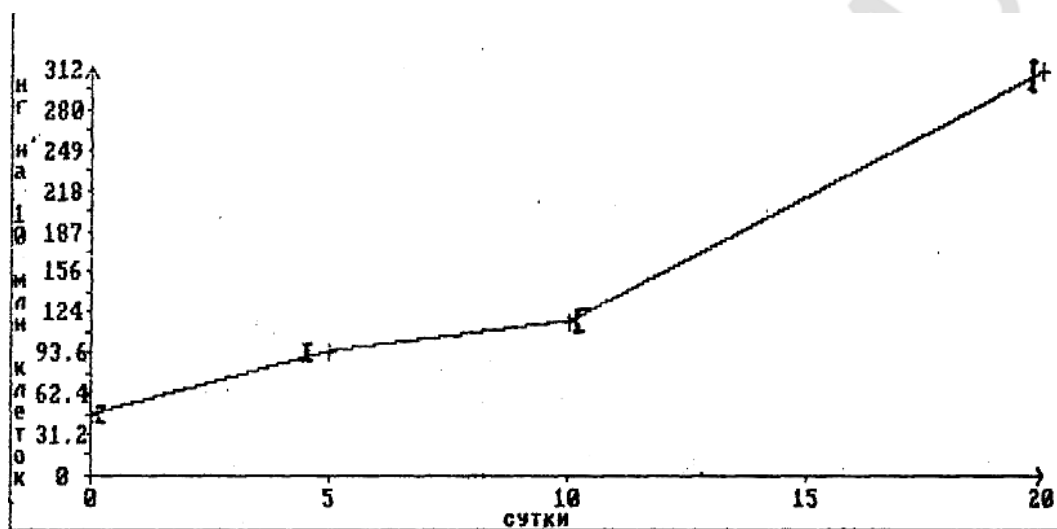


Рис. 3.8. Накопление клеточного свинца в спленоцитах ($\text{нг}/1 \cdot 10^7$ клеток) при свинцовой интоксикации

Крысам-самцам Wistar вводили внутрибрюшинно ацетат свинца в дозе $5 \text{ мг Pb}^{2+}/\text{кг}$ ежедневно в течение 20 дней. На 5, 10 и 20-е сутки животных забивали декапитацией, выделяли спленоциты и проводили количественное определение ионов свинца на атомно-абсорбционном спектрофотометре AAS-1 (Германия) при длине волны регистрации $266,3 \text{ нм}$. На горизонтальной оси — длительность свинцовой интоксикации (сутки); на вертикальной оси — содержание клеточного свинца в спленоцитах в нг на $1 \cdot 10^7$ клеток свинца.

Говоря о содержании свинца в спленоцитах, следует иметь в виду, что в данном случае речь не идет о внутриклеточной концентрации ионов свинца. Несомненно, определенный вклад в общее содержание свинца в спленоцитах вносят ионы свинца, связанные с наружной клеточной мембраной. В этом плане особый интерес представляют данные атомно-абсорбционной спектрофотометрии об общем содержании клеточного кальция, свидетельствующие о том, что 90–95 % клеточного кальция связано с экстрацеллюлярными лигандами [85]. Учитывая высокую способность ионов свинца к связыванию с фосфолипидами и белками [18], мож-

но полагать, что значительное количество свинца, как и ионов кальция, связывается с плазматической мембраной спленоцитов. Поэтому, при описании содержания свинца в спленоцитах, мы будем пользоваться термином «общий клеточный свинец», подразумевая под этим суммарное содержание внутриклеточного свинца и свинца, связанного с экстраклеточными лигандами.

При анализе данных атомно-абсорбционной спектроскопии о содержании свинца в спленоцитах видно, что уже к 5-му дню эксперимента содержание общего клеточного свинца в спленоцитах опытных крыс удваивается по сравнению с контролем. К 10-му дню опыта содержание общего свинца в спленоцитах достигает значения 118 нг/10 млн клеток, а к 20-му дню увеличивается ~ в 6,5 раз по сравнению с контролем.

Таким образом, становится очевидным факт значительного накопления общего клеточного свинца в спленоцитах крыс в динамике свинцовой интоксикации.

Исследование интенсивности синтеза ДНК, РНК и белка в спленоцитах крыс проводилось через 5, 10 и 20 дней после внутрибрюшинного введения ацетата свинца в дозе 5 мг Pb^{2+} /кг ежедневно (табл. 3.6, 3.7).

Таблица 3.6

Влияние ацетата свинца (5 мг Pb^{2+} /кг) на включение радиоактивных предшественников в ДНК и РНК спленоцитов крыс (имп/мин на $5 \cdot 10^6$ клеток)

Включение радиоактивных предшественников	Условия опыта		
	5 суток	10 суток	20 суток
ДНК:			
Контроль	2694 ± 72	2464 ± 36	8577 ± 601
Опыт	2495 ± 121 (4)	9150 ± 349* (4)	8368 ± 179 (4)
Тотальная РНК:			
Контроль	14400 ± 240	12699 ± 490	37110 ± 977
Опыт	13430 ± 1221 (4)	18933 ± 1129* (4)	6648 ± 217* (4)
Нерибосомальные РНК:			
Контроль	6138 ± 297	4890 ± 262	23440 ± 545
Опыт	6133 ± 211 (4)	7131 ± 536* (4)	3894 ± 215* (4)
pРНК:			
Контроль	8262 ± 110	7809 ± 241	13670 ± 770
Опыт	7297 ± 1103 (4)	11802 ± 612* (4)	2753 ± 89* (4)

**Влияние ацетата свинца (5 мг Pb²⁺ /кг) на включение ¹⁴C-гидролизата
в белки спленоцитов крыс (имп/мин на 5·10⁶ клеток)**

Включение радиоактивной метки	Условия опыта		
	5 суток	10 суток	20 суток
Клетки + ¹⁴C-гидролизат:			
Контроль	2527 ± 76	1874 ± 55	4524 ± 308
Опыт	1452 ± 70* (4)	3394 ± 149* (4)	2532 ± 118* (4)
Клетки + 0,15 мкг АД + ¹⁴C-гидролизат:			
Контроль	2006 ± 91	1443 ± 61	4019 ± 129
Опыт	1326 ± 73* (4)	2635 ± 97* (4)	2258 ± 144* (4)

Рассмотрим, в первую очередь, характер изменений синтеза ДНК в спленоцитах в динамике свинцового отравления. Видно, что на 5-е сутки свинцового отравления количество включенного ³H-тимидина в ДНК спленоцитов не отличается от такового у контрольных животных. На 10-е сутки свинцового отравления наблюдается достоверное увеличение количества включенной метки, что, по-видимому, является отражением стабилизирующего влияния ионов свинца на структуру ДНК и (или) непосредственной активации синтеза ДНК. Отсутствие различий во включении ³H-тимидина в ДНК спленоцитов опытных и контрольных животных на 20-е сутки, вероятно, обусловлено ингибированием ранее повышенного (10-е сутки) синтеза ДНК при свинцовой интоксикации. Это предположение основано на данных литературы о том, что ионы свинца в условиях *in vitro* ингибируют активность ДНК-полимеразы клеток HeLa и ДНК-полимеразы *E. coli* [127]. Кроме того, в данном случае нельзя исключить возможность дестабилизирующего влияния ионов свинца на структуру ДНК, приводящего к увеличению скорости распада новосинтезированной ДНК у опытных животных по сравнению с контролем.

При анализе данных о включении ³H-уридина в РНК спленоцитов видно, что на 10-е сутки свинцовой интоксикации достоверно увеличено количество включенной метки в тотальную клеточную РНК, рРНК и нерибосомальные РНК спленоцитов опытных животных по сравнению с контролем. Следует подчеркнуть, что увеличение количества включенного ³H-уридина в рРНК спленоцитов опытных животных нельзя объяснить активацией синтеза рРНК, поскольку в проведенных ранее экспериментах мы обнаружили угнетение синтеза предшественника рибосомальной РНК —

45S пре-рРНК (табл. 3.2). По-видимому, это увеличение является следствием накопления более стабильных форм рРНК в цитоплазме и (или) ингибирования ионами свинца активности рибонуклеаз [91, 204].

Что касается увеличения включения ^3H -уридина в нерибосомальные РНК спленоцитов при свинцовом отравлении, то оно, возможно, обусловлено как стабилизацией структуры макромолекул и накоплением стабильных форм, угнетением активности рибонуклеаз, так и активацией синтеза нерибосомальных РНК, происходящей, вероятно, за счет стимуляции ионами свинца биосинтеза тРНК (табл. 3.2, 3.4).

К 20-му дню свинцовой интоксикации, наоборот, обнаруживается значительное снижение количества включенного радиоактивного предшественника в тотальную клеточную РНК, рРНК и нерибосомальные РНК спленоцитов опытных животных по сравнению с контролем. Известно, что ионы свинца в условиях *in vitro* ингибируют активность РНК-полимераз *E. coli* и клеток HeLa [127]. Кроме того, нашими предыдущими исследованиями доказано, что ионы свинца могут ингибировать РНК-синтетическую активность и синтез всех предшественников РНК (табл. 3.3). Эти данные позволяют полагать, что обнаруженное снижение количества включенного ^3H -уридина в РНК спленоцитов крыс к 20-му дню свинцового отравления по сравнению с контрольными животными обусловлено ингибированием синтеза РНК. Возможно также, что определенный вклад в снижение количества включенного радиоактивного предшественника в РНК спленоцитов крыс при свинцовой интоксикации вносит РНК-деполимеризующее действие ионов свинца, что приводит к увеличению скорости распада новосинтезированных РНК у опытных животных по сравнению с контролем.

При анализе изменений синтеза белка в спленоцитах крыс в динамике свинцового отравления видно, что они носят волнообразный характер.

Так, на 5-е сутки наблюдается достоверное уменьшение количества включенного ^{14}C -гидролизата в новосинтезированные белки опытных животных по сравнению с контролем, на 10-е сутки обнаруживается увеличение количества включенной метки в белки спленоцитов опытных крыс, а к 20-м суткам свинцового отравления снова наблюдается снижение включения радиоактивного предшественника в новосинтезированные белки спленоцитов опытных крыс по сравнению с контрольными животными.

Имеется обширная литература о том, что увеличение синтеза белка происходит вскоре после антигенной активации лимфоцитов [140, 141].

Как указывалось ранее, сами по себе тяжелые металлы и их соли не являются антигенами, но, вступая в организме в соединение с белками, они приобретают новые свойства, в том числе, способность стимулировать иммунокомпетентную систему [48]. Не исключено, что, образовав химическое соединение с белком, ионы свинца способствуют формированию чуждого для организма антигена, который, возможно, вызывает активацию спленоцитов, что в конечном счете проявляется увеличением синтеза белка (и возможно также ДНК и рибосомальных РНК) в спленоцитах крыс на 10-е сутки свинцового отравления по сравнению с контролем. Интересен тот факт, что активация синтеза белка в спленоцитах опытных животных не зависит от синтеза рРНК *de novo*. Уменьшение включения ^{14}C -гидролизата в новосинтезированные белки спленоцитов опытных крыс по сравнению с контролем к 20-м суткам эксперимента, по-видимому, является отражением общетоксического действия ацетата свинца.

В другой серии опытов крысам-самцам Wistar вводили ацетат свинца в дозе $25 \text{ мг Pb}^{2+}/\text{кг}$ массы внутривенно ежедневно на протяжении 3-х суток, а впоследствии животных содержали в течение 18 суток на обычном рационе вивария.

Определение содержания свинца в спленоцитах проводили на 3-ти и 21-е сутки после начала опыта (рис. 3.9). При анализе полученных данных следует отметить факт увеличения содержания клеточного свинца ~ в 4,5 раза по сравнению с контролем в спленоцитах крыс после инъекций ацетата свинца в большей дозе ($25 \text{ мг Pb}^{2+}/\text{кг}$) уже на 3-ти сутки проведения эксперимента. Дальнейшее содержание животных на обычном рационе вивария приводит к снижению содержания общего клеточного свинца в спленоцитах опытных животных, не достигающего, однако, контрольного уровня.

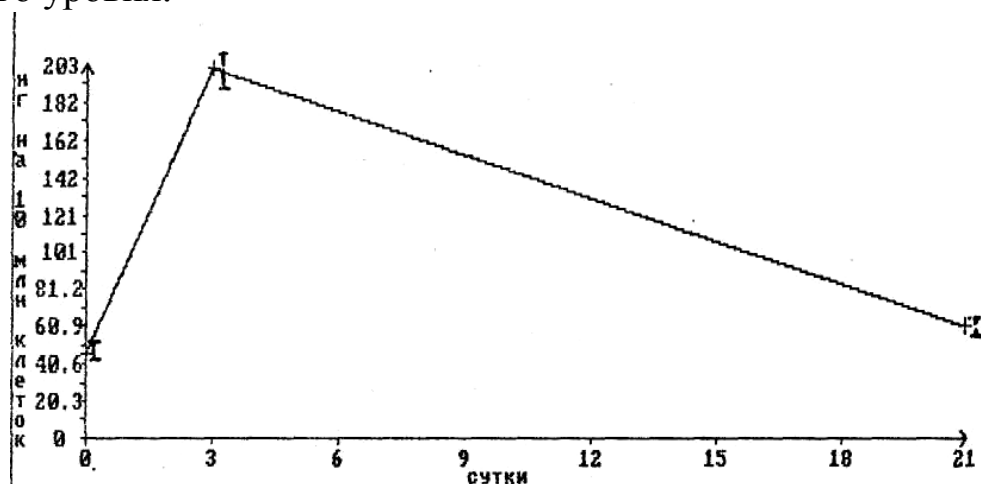


Рис. 3.9. Содержание общего клеточного свинца в спленоцитах крыс при свинцовой интоксикации и в восстановительный период

Крысам-самцам *Wistar* вводили ацетат свинца в дозе 25 мг Pb^{2+} /кг массы внутривенно ежедневно на протяжении 3 суток, а впоследствии животных содержали на обычном рационе вивария в течение 18 суток. Определение содержания свинца в спленоцитах проводили на 3-и и 21-е сутки после начала опыта на атомно-абсорбционном спектрофотометре AAS-1 (Германия) при длине волны регистрации 266,3 нм. На горизонтальной оси — продолжительность эксперимента (сутки); на вертикальной оси — содержание клеточного свинца в спленоцитах в нг на $1 \cdot 10^7$ клеток.

Исследование интенсивности синтеза ДНК, РНК и белка в спленоцитах крыс проводилось на 3-и и 21-е сутки эксперимента (табл. 3.8, 3.9).

Таблица 3.8

Влияние ацетата свинца (25 мг Pb^{2+} /кг) на включение радиоактивных предшественников в ДНК и РНК спленоцитов крыс (имп/мин на $5 \cdot 10^6$ клеток)

Включение радиоактивных предшественников	Условия опыта	
	3 суток	21 сутки
ДНК:		
Контроль	12954 ± 449	6190 ± 168
Опыт	3220 ± 129* (4)	70288 ± 7185* (4)
Тотальная РНК:		
Контроль	10282 ± 627	34994 ± 2507
Опыт	5741 ± 400* (4)	82382 ± 3351* (4)
Нерибосомальные РНК:		
Контроль	4914 ± 108	12086 ± 830
Опыт	2250 ± 115* (4)	53357 ± 5243* (4)
pРНК:		
Контроль	5368 ± 521	22908 ± 1717
Опыт	3491 ± 286* (4)	29025 ± 2310* (4)

При анализе результатов эксперимента видно, что на 3-и сутки после начала внутривенного введения крысам ацетата свинца в дозе 25 мг Pb^{2+} /кг, наблюдается достоверное угнетение ~ в 2 раза синтеза ДНК, всех типов новосинтезированных РНК и белка.

Влияние ацетата свинца (25 мг Pb²⁺/кг) на включение ¹⁴C-гидролизата в белки спленоцитов крыс (имп/мин на 5·10⁶ клеток)

Включение радиоактивной метки	Условия опыта	
	3 суток	21 сутки
Клетки + ¹⁴C-гидролизат:		
Контроль	10138 ± 283	6859 ± 182
Опыт	5739 ± 220* (4)	6687 ± 331 (4)
Клетки + 0,15 мкг АД + ¹⁴C гидролизат:		
Контроль	3062 ± 129	5787 ± 77
Опыт	1761 ± 88* (4)	6599 ± 340 (4)

Эти данные убедительно показывают, что использование в экспериментах высокой дозы ионов свинца в качестве «внезапного химического удара» является для клеток наиболее опасным, так как резко сокращает время, необходимое для достижения общетоксического действия ионов свинца.

Учитывая тот факт, что в общих механизмах токсического действия на клеточном и субклеточном уровнях воздействия преимущественная роль в конечной реализации эффекта принадлежит молекулярным механизмам, становится понятным угнетение макромолекулярных биосинтетических процессов в спленоцитах.

Последующее содержание крыс на обычном рационе вивария в течение 18 суток приводит к резкому увеличению включения радиоактивных предшественников в ДНК и РНК.

Таким образом, полученные нами данные в опытах *in vitro* и *in vivo* свидетельствуют в пользу представлений о том, что при свинцовой интоксикации наблюдается двухфазный характер изменений включения радиоактивных предшественников в макромолекулы.

С определённой осторожностью можно сделать предположение о наличии концентрационно различных критических уровней ионов свинца в спленоцитах, оказывающих разнонаправленное влияние (стабилизация или деполимеризация) на структуру макромолекул. По-видимому, в зависимости от содержания общего клеточного свинца в спленоцитах могут возникать различные фазы — адаптации, компенсации или истощения, проявляющиеся отсутствием эффекта, активацией или ингибированием макромолекулярных биосинтетических процессов.

Глава 4

РОЛЬ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ, КАЛЬЦИЙ-КАЛЬМОДУЛИНОВОЙ СИСТЕМЫ, ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ И ПРОСТАГЛАНДИНОВ В МЕХАНИЗМАХ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ АЦЕТАТА СВИНЦА

При исследовании механизмов действия соединений тяжелых металлов, в том числе и свинца, на клеточном уровне вопрос о том, что служит регулятором, который запускает всю цепь биохимических событий, приводящих к цитотоксическому эффекту, является одним из ключевых.

В настоящее время известны многочисленные данные, свидетельствующие о том, что для различных типов клеток основным в механизме действия физиологически активных веществ и ксенобиотиков является активация транспорта в клетку ионов Ca^{2+} [21]. Сведений о роли трансмембранных потоков ионов кальция в токсическом действии ацетата свинца на иммунокомпетентные клетки нами в литературе не обнаружено.

Одним из важнейших факторов, определяющих ионную проницаемость клеточных мембран, является интенсивность процессов перекисного окисления липидов в них. Данные о состоянии процессов ПОЛ в различных типах клеток под влиянием ионов свинца немногочисленны и довольно разноречивы [17, 19, 83, 128, 175, 183, 200, 218].

В середине 80-х гг. прошлого столетия впервые было установлено, что кальмодулин может связывать не только ионы Ca^{2+} , но и ионы тяжелых металлов, особенно ионы Pb^{2+} и Cd^{2+} [96, 139]. Несмотря на эти интересные сообщения, феномен образования активного Pb^{2+} -кальмодулинового комплекса не был по достоинству оценен и активно не исследовался. К началу наших исследований в литературе отсутствовали какие-либо данные экспериментальных исследований о роли кальмодулина в механизме взаимодействия ионов свинца с иммунокомпетентными клетками.

Кальций-кальмодулиновая система и система циклических нуклеотидов совместно регулируют поведение клетки [49]. Кроме того, многие эффекты ионов Ca^{2+} и цАМФ реализуются при участии общего для этих двух посредников механизма — путем регуляции активности протеинкиназ, катализирующих фосфорилирование белков. Именно эта модификация различных белков лежит в основе изменений клеточного поведения, вызываемых рядом внешних стимулов [49]. В этом аспекте небезынтересно отметить способность ионов свинца активировать протеинкиназу С, которая, как установлено в последние годы, играет существенную роль в регуляции внутриклеточного уровня ионов кальция [49]. Так, добавление

ионов свинца к гомогенату микрососудов мозга крыс активирует протеинкиназу С в такой же степени, что и ионы кальция. Преинкубация интактных микрососудов с ионами свинца приводит к транслокации цитозольной протеинкиназы С в мембранную фракцию клеток. Цитозольная форма протеинкиназы С, активируемая ионами свинца, характеризуется такой же зависимостью активности от диацилглицерина и фосфатидилсерина, что и протеинкиназа С, активируемая ионами кальция [168]. Авторы полагают, что активация протеинкиназы С ионами свинца реализуется благодаря тому же механизму, что и активация фермента ионами кальция.

Участие простагландинов в формировании клеточного ответа на действие соединений свинца можно предполагать, исходя из несомненно-го интимного взаимоотношения циклических нуклеотидов и простагландинов [1].

Учитывая вышеизложенные факты и соображения, нами было проведено исследование, направленное на выяснение роли перекисного окисления липидов, Ca^{2+} -кальмодулиновой системы, циклических нуклеотидов и простагландинов в механизме токсического действия ацетата свинца на спленоциты крыс.

4.1. ВЛИЯНИЕ АЦЕТАТА СВИНЦА НА ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ В СПЛЕНОЦИТАХ КРЫС

Особое значение в химической патологии в последнее время отводится роли перекисного окисления липидов (ПОЛ). Усиление ПОЛ является универсальным фактором повышения проницаемости мембран, т. е. может быть непосредственным механизмом цитолиза. Поэтому усиление ПОЛ относится к общим механизмам токсичности [12].

В литературе имеются противоречивые данные о влиянии соединений свинца на показатели ПОЛ.

Так, *Vochev* установил, что ионы свинца Pb^{2+} не вызывают развитие ПОЛ в липосомах [83]. По данным *Rana* и *Rumar*, свинец в дозе 0,005 г/кг, вводимый внутрижелудочно через зонд крысам в течение 30 дней не усиливал образование перекисей липидов (малонового диальдегида) в печени животных [200].

Gabor и соавт. установили, что введение крысам-самцам *Wistar* ацетата свинца в дозе 20 мг Pb^{2+} /кг внутрибрюшинно ежедневно на протяжении 6 дней стимулировало ПОЛ в печени и почках, что сопровождалось увеличением содержания в них малонового диальдегида по сравнению с

контролем с 0,02 до 0,029 и с 0,041 до 0,055 отн. ед/мг ткани соответственно [128]. По данным Кадийска и соавт., через 1 сутки после подкожного введения крысам Wistar токсичных доз солей свинца снижалась окислительная способность микросомальных мембран клеток печени [19].

Ежкова и соавт. показали, что при ежедневном введении кроликам внутрь 5 %-ного раствора ацетата свинца 1 мг/кг отмечено резкое снижение в крови активности супероксиддисмутазы (СОД), каталазы и глутатионпероксидазы [17]. Снижение активности супероксиддисмутазы под влиянием ионов свинца отмечают и Mylroie с соавт. [175].

Введение мышам ацетата свинца в дозе 100 мг/кг внутрибрюшинно приводило к снижению в печени содержания восстановленного глутатиона с 7–8 до 5 мкмоль/г, а также к снижению активности глутатион-S-трансферазы со 180 до 140 нмоль/мин на 1 мг белка [183].

Sugawara и соавт. установили, что у рабочих, имеющих на производстве контакт со свинцом (содержание Pb^{2+} в крови — 57,1 мкг %), содержание перекисей липидов в мембранах эритроцитов было повышено по сравнению с контролем с 15,5 до 25,2 пмоль/ 10^7 клеток, содержание восстановленного глутатиона снижено по сравнению с контролем до 69 %, а активность супероксиддисмутазы была снижена в среднем в 2,5 раза [218].

По данным Munter и соавт., тетраэтилсвинец ингибирует активность мембранной Na^+ , K^+ -АТФазы из клеток HeLa (IC_{50} 12 мкМ) и гидролиз АТФ комплексом F_0-F_1 -АТФазы митохондрий (IC_{50} 17 мкМ). Добавление 1 мМ глутатиона полностью восстанавливало активность обоих ферментов [181].

Имеющиеся литературные данные о влиянии соединений свинца на показатели перекисного окисления липидов, а также универсальность критерия ПОЛ для оценки токсичности химических соединений подтолкнули нас к изучению влияния ацетата свинца на некоторые показатели перекисного окисления липидов в спленоцитах крыс.

Полученные данные представлены в таблице 4.1. При их анализе видно, что в Pb^{2+} -обработанных спленоцитах (100 мкМ) наблюдается достоверное увеличение содержания конечного продукта ПОЛ малонового диальдегида на протяжении всего периода культивирования клеток по сравнению с контролем, что указывает на активацию процессов перекисного окисления липидов в спленоцитах под влиянием ионов свинца.

**Влияние ацетата свинца (100 мкМ) на показатели перекисного окисления
липидов в спленоцитах крыс**

Условия	Показатели ПОЛ		
	Малоновый диальдегид, мкМ/10 ⁶ клеток	Глутатион-редуктаза, мкМ НАДФН/1 ч·10 ⁶ клеток	Восстановленный глутатион, мкМ/10 ⁶ клеток
Контроль (4 ч)	0,158 ± 0,013 (6)	0,080 ± 0,003 (5)	0,047 ± 0,003 (6)
Опыт (4 ч)	0,271 ± 0,030* (6)	0,105 ± 0,003* (5)	0,234 ± 0,006* (6)
Контроль (10 ч)	0,263 ± 0,016 (6)	0,027 ± 0,001 (6)	0,046 ± 0,002 (6)
Опыт (10 ч)	0,366 ± 0,018* (6)	0,019 ± 0,001* (6)	0,160 ± 0,005* (6)

Какова бы ни была причина активации ПОЛ в Pb²⁺-обработанных спленоцитах следует ожидать структурно-модифицирующих эффектов перекисного окисления: «выгорания» преимущественно тех липидов, которые содержат непредельные жирные кислоты, уменьшения индекса ненасыщенности, образования внутри- и межмолекулярных сшивок и т. д. [144].

Активность глутатионредуктазы на начальных этапах культивирования спленоцитов (4 ч) в присутствии ацетата свинца (100 мкМ) значительно повышена по сравнению с контролем. При увеличении продолжительности культивирования клеток до 10 ч активность глутатионредуктазы в Pb²⁺-обработанных спленоцитах падает и достоверно снижена по сравнению с интактными клетками.

При оценке содержания восстановленного глутатиона в спленоцитах интересно отметить достоверное увеличение концентрации восстановленного глутатиона в Pb²⁺-обработанных клетках по сравнению с интактными.

Однако при рассмотрении в динамике содержания восстановленного глутатиона в спленоцитах обращает на себя внимание тот факт, что в интактных клетках концентрация глутатиона остается неизменной, а в Pb²⁺-обработанных спленоцитах достоверно падает с 4-го по 10-й ч культивирования.

Активацию глутатионредуктазы и соответствующее увеличение внутриклеточного пула восстановленного глутатиона на начальных этапах культивирования спленоцитов с ацетатом свинца, по-видимому, мож-

но рассматривать как защитный механизм, предохраняющий плазматические и клеточные мембраны от действия перекисей и свободных радикалов, образующихся в клетках под влиянием ионов свинца.

Снижение активности глутатионредуктазы в Pb^{2+} -обработанных спленоцитах по сравнению с контролем при увеличении длительности культивирования клеток до 10 ч, а также достоверное уменьшение уровня восстановленного глутатиона в Pb^{2+} -обработанных спленоцитах, культивируемых в течение 10 ч, по сравнению с таковыми, культивируемыми в течение 4-х ч, позволяют сделать предположение об истощении компенсаторных защитных механизмов, принимающих активное участие в защите белков и липидов мембран от перекисей и свободных радикалов [143].

4.2. РОЛЬ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ В ЦИТОТОКСИЧЕСКОМ ДЕЙСТВИИ АЦЕТАТА СВИНЦА

Известно, что внутриклеточная концентрация кальция составляет 10^{-7} – 10^{-6} М, а во внеклеточной жидкости содержится 10^{-3} М кальция [12]. Такой большой градиент концентрации, направленный внутрь клетки, а также отрицательный заряд клетки создают условия для пассивного поступления ионов кальция внутрь клетки. Несмотря на это, поступление ионов кальция в клетки при отсутствии действия стимулов довольно незначительно, следовательно, плазматическая мембрана относительно непроницаема для кальция, благодаря чему многие клетки малочувствительны к изменениям концентрации кальция в окружающей среде [58].

Нарушение проницаемости клеточных мембран сопровождается усиленным проникновением ионов кальция внутрь клеток. Ионы кальция биологически очень активны, способны вызывать глубокие изменения внутриклеточного метаболизма и приводить в конечном итоге к появлению некротических очагов и гибели клетки [166]. Нарушение целостности клеточных мембран может иметь различную природу. В одних случаях — это усиление перекисного окисления липидов, входящих в состав клеточных мембран, в других — блокада сульфгидрильных групп белковых молекул, входящих в состав биомембран [57]. Следствием же, приводящим к гибели клетки, является нарушение кальциевого гомеостаза — значительное проникновение в клетки Ca^{2+} через поврежденную мембрану по электрохимическому градиенту.

На примере интоксикаций четыреххлористым углеродом, галактозамином и динитрилнитрозамином показано, что повреждение проницаемо-

сти клеточных мембран сопровождается усиленным проникновением кальция в гепатоциты [166].

Исследования с эритроцитами показали, что ионы свинца изменяют проницаемость мембран, блокируют активные центры-насосы [232]. Помимо этого, они связываются с сульфгидрильными, фосфатными и карбоксильными группами мембран, увеличивают их жесткость и снижают устойчивость к осмотическому шоку [163].

Согласно современной концепции об общем конечном пути гибели клеток при воздействии различных цитотоксических агентов, происходит повреждение клеточных мембран, изменение их проницаемости и значительное поступление ионов Ca^{2+} внутрь клеток, которое приводит к различным биохимическим изменениям в клетках, в том числе, к разрушению цитоскелета, фрагментации ДНК, Ca^{2+} -зависимой активации фосфолипаз, протеаз и эндонуклеаз [184], что в конечном итоге индуцирует гибель клеток [188].

Учитывая приведенные выше данные о влиянии ацетата свинца на интенсивность процессов перекисного окисления липидов в спленоцитах крыс, можно полагать, что под влиянием ионов свинца происходит изменение проницаемости мембран спленоцитов, способствуя, тем самым, значительному проникновению внутрь клеток ионов Ca^{2+} . Не исключено, что нарушение кальциевого гомеостаза спленоцитов играет определенную роль в проявлении токсического действия ионов свинца на клеточном и субклеточном уровнях, приводя в конечном счете к токсической гибели клеток.

Поэтому возник естественный вопрос о характере влияния ацетата свинца на интенсивность макромолекулярных биосинтетических процессов в спленоцитах крыс, культивируемых в бескальциевой среде. Данные по включению ^3H -тимидина в ДНК интактных и Pb^{2+} -обработанных спленоцитов, культивируемых в кальциевой (среда 199) и бескальциевой (среда Joklik) средах, представлены в таблице 4.2.

При анализе полученных данных видно, что в среде 199 наблюдается достоверное увеличение включения радиоактивной метки в ДНК Pb^{2+} -обработанных спленоцитов по сравнению с контролем к 3-му ч культивирования клеток. Этот эффект реализуется и в отсутствие внеклеточного кальция в среде культивирования. Следует отметить, что при культивировании спленоцитов с 5-го по 10-й ч опыта в среде 199 происходит достоверное увеличение включения ^3H -тимидина в ДНК как интактных,

так и Pb^{2+} -обработанных спленоцитов. Удаление ионов Ca^{2+} из культуральной среды приводит к тому, что с 5-го по 10-й ч культивирования не наблюдается увеличения включения радиоактивного предшественника в ДНК интактных и Pb^{2+} -обработанных спленоцитов.

Таблица 4.2

Включение 3H -тимидина в ДНК интактных и Pb^{2+} -обработанных (10 мкМ) спленоцитов крыс, культивируемых в кальциевой и бескальциевой средах

Условия культивирования	Время культивирования, ч			
	3	4	5	10
Кальциевая среда:				
контроль	13258 ± 407	22327 ± 446	27057 ± 1199	35347 ± 562**
Клетки + $Pb(CH_3COO)_2$ 10 мкМ	17624 ± 312* (4)	33667 ± 5726 (4)	25262 ± 1841 (4)	34502 ± 2548** (4)
Бескальциевая среда:				
контроль	14542 ± 316	19747 ± 1804	26097 ± 5616	25753 ± 667
Клетки + $Pb(CH_3COO)_2$ 10 мкМ	16067 ± 1689 (4)	18381 ± 2650 (4)	37472 ± 8884* (4)	27192 ± 1270 (4)

Примечание: * — изменения достоверны по отношению к контролю ($P < 0,05$);
** — изменения достоверны по отношению к 5-му ч ($P < 0,05$).

Данные по включению 3H -уридина в РНК интактных и Pb^{2+} -обработанных спленоцитов крыс, культивируемых в кальциевой и бескальциевой средах, представлены в таблице 4.3.

Таблица 4.3

Включение 3H -уридина в РНК интактных и Pb^{2+} -обработанных (10 мкМ) спленоцитов крыс, культивируемых в кальциевой и бескальциевой средах

Условия культивирования	Время культивирования, ч			
	3	4	5	10
Кальциевая среда:				
контроль	18086 ± 905	19253 ± 651	28312 ± 3728	36803 ± 2547**
Клетки + $Pb(CH_3COO)_2$ 10 мкМ	175644 ± 558 (4)	23369 ± 1307* (4)	30363 ± 1191 (4)	39369 ± 2264** (4)
Бескальциевая среда:				
контроль	15912 ± 1506	16353 ± 1120	17592 ± 436	18212 ± 1509
Клетки + $Pb(CH_3COO)_2$ 10 мкМ	17852 ± 833 (4)	19067 ± 508 (4)	25959 ± 909* (4)	21040 ± 1596** (4)

Примечание: * — изменения достоверны по отношению к контролю ($P < 0,05$);
** — изменения достоверны по отношению к 5-му ч ($P < 0,05$).

При анализе полученных данных видно, что к 4-му ч культивирования клеток в среде 199 наблюдается достоверное увеличение включения ^3H -уридина в РНК Pb^{2+} -обработанных спленоцитов по сравнению с интактными. Удаление кальция из культуральной среды не влияет на реализацию этого эффекта в Pb^{2+} -обработанных спленоцитах. При рассмотрении кинетики включения ^3H -уридина в РНК спленоцитов с 5-го по 10-й ч культивирования клеток обращает на себя внимание тот факт, что при наличии кальция в среде культивирования наблюдается достоверное увеличение включения радиоактивной метки в РНК как интактных, так и Pb^{2+} -обработанных спленоцитов. Удаление кальция из культуральной среды нивелирует этот эффект в интактных клетках и приводит к достоверному уменьшению включения ^3H -уридина в РНК Pb^{2+} -обработанных спленоцитов. Исследование роли внеклеточных ионов кальция в механизме цитотоксического действия ацетата свинца показало, что фаза токсического действия ионов свинца на спленоциты на начальных этапах культивирования клеток, выражающаяся в повышенном включении радиоактивных предшественников в ДНК и РНК Pb^{2+} -обработанных спленоцитов по сравнению с контролем, реализуется как при наличии, так и при отсутствии ионов Ca^{2+} в среде культивирования, т. е. не зависит от трансмембранного потока ионов кальция.

Сравнительный анализ кинетики включения радиоактивных предшественников в ДНК и РНК спленоцитов с 5-го по 10-й ч культивирования клеток в кальциевой и бескальциевой средах свидетельствует в пользу того, что трансмембранный перенос ионов кальция играет существенную роль в механизмах спонтанного синтеза ДНК и РНК в интактных и Pb^{2+} -обработанных спленоцитах. Это предположение подтверждается данными литературы, что синтез ДНК весьма чувствителен к снижению внеклеточной концентрации ионов кальция [68, 88]. Отсутствие ожидаемого прироста включения радиоактивных меток в ДНК и РНК интактных и Pb^{2+} -обработанных спленоцитов с 5-го по 10-й ч культивирования в бескальциевой среде может быть следствием как угнетения синтеза, так и увеличением скорости распада нуклеиновых кислот. Таким образом, внеклеточные ионы кальция являются необходимыми не только для нормального синтеза ДНК и РНК в интактных клетках, но и в определенной степени проявляют защитное действие на синтез нуклеиновых кислот в Pb^{2+} -обработанных спленоцитах.

В литературе имеются данные о защитном действии ионов Ca^{2+} при отравлении свинцом. Так, увеличение содержания кальция и фосфора в рационе цыплят оказывает защитное действие при свинцовой интоксикации [2]. Нервно-мышечная блокада, вызываемая соединениями свинца, снимается ионами Ca^{2+} [211]. Эффект влияния ионов Pb^{2+} на синаптическую передачу в периферической нервной системе также является обратимым по отношению к ионам Ca^{2+} [156].

4.3. Влияние хлорпромазина — антагониста кальмодулина на включение радиоактивных предшественников в ДНК, РНК и белок Pb^{2+} -обработанных спленоцитов

Кальмодулин — главный внутриклеточный рецептор ионов Ca^{2+} — локализуется в цитозоле (растворимая форма) и мембранах (связанная форма) всех эукариотических клеток и является регулятором активности многих ключевых ферментов и клеточных процессов [97].

Кальмодулин прямо вовлечен в ответы лимфоцитов при митогенной и аллогенной стимуляции [198, 231]. Эти данные показывают, что кальмодулин может быть ключевым цитоплазматическим фактором в модулировании иммунологических реакций.

Имеются сведения о непосредственном взаимодействии ионов свинца с кальмодулином в опытах *in vitro* [230]. Поэтому не исключено, что кальмодулин может являться одной из внутриклеточных мишеней для ионов свинца. Данные о роли кальмодулина в механизме токсического действия соединений свинца в литературе отсутствуют.

С учетом этого было решено провести исследование роли кальмодулина в развитии токсического действия ацетата свинца на спленоциты крыс. Для исследования роли кальмодулин-зависимых процессов в цитотоксическом действии ионов свинца применяли подход, основанный на использовании хлорпромазина — антагониста кальмодулина. Для достижения равновесного состояния процесса связывания хлорпромазина с кальмодулином проводили 60-минутную преинкубацию клеток с вышеупомянутым препаратом.

Данные о влиянии хлорпромазина на синтез ДНК в интактных и Pb^{2+} -обработанных (10 мкМ) спленоцитах представлены на рисунке 4.1.

При анализе полученных кинетических кривых синтеза ДНК видно, что к 5-му ч культивирования клеток наблюдается достоверное увеличение включения ^3H -тимидина в ДНК Pb^{2+} -обработанных спленоцитов по

сравнению с интактными клетками. Описанный эффект нивелируется к 10-му ч культивирования спленоцитов. Следует отметить, что при предварительной обработке клеток хлорпромазином (10 мкМ) наблюдается достоверное уменьшение включения радиоактивного тимидина в ДНК как интактных, так и культивируемых в присутствии ацетата свинца спленоцитов. Однако характер кинетики включения ^3H -тимидина в ДНК спленоцитов, обработанных хлорпромазином, остаётся прежним: достоверное увеличение включения радиоактивной метки в ДНК Pb^{2+} -обработанных спленоцитов по сравнению с контролем к 5-му ч культивирования, которое нивелируется к 10-му ч культивирования спленоцитов.

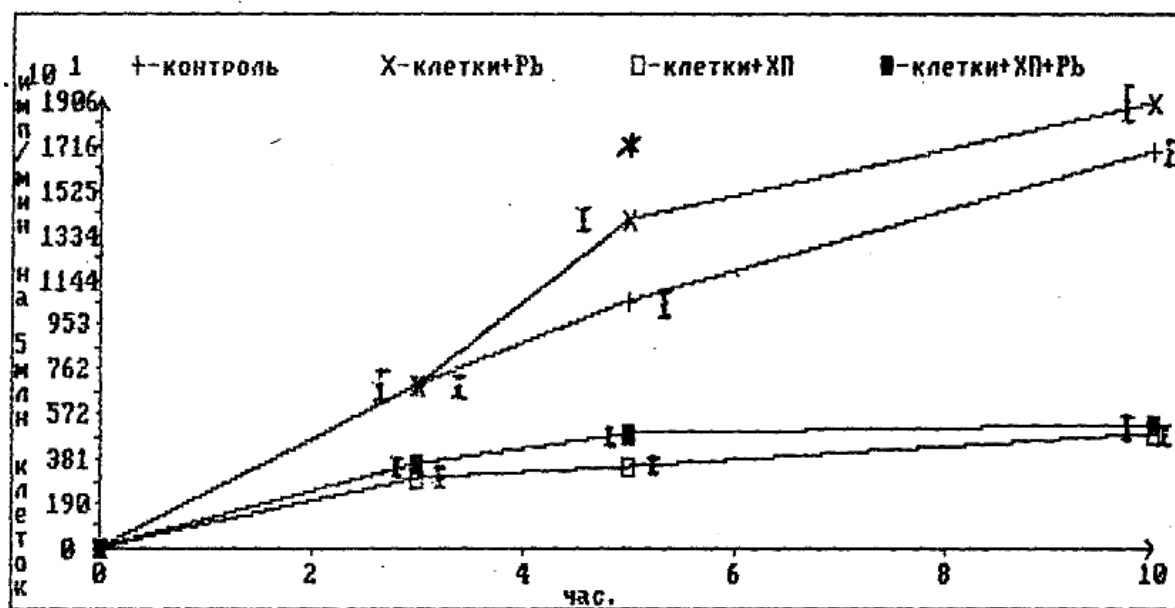


Рис. 4.1. Влияние хлорпромазина на кинетику включения ^3H -тимидина в ДНК интактных и Pb^{2+} -обработанных спленоцитов

Свежеизолированные спленоциты ($5 \cdot 10^6$ клеток на 1 мл культуры) инкубировали в среде 199. Такое же количество спленоцитов параллельно инкубировали с добавлением 10 мкМ ацетата свинца. После 60-минутной преинкубации части контрольных и опытных клеточных культур с хлорпромазином (10 мкМ) в культуры вносили ^3H -тимидин (5 МкКи/мл) на весь период культивирования. Синтез прерывали через 3, 5 и 10 ч. Количество включенного радиоактивного предшественника оценивали по радиоактивности кислотоосаждаемого материала (см. главу 2). На горизонтальной оси — время культивирования спленоцитов (час); на вертикальной оси — количество включенного ^3H -тимидина в ДНК в импульсах в минуту на $5 \cdot 10^6$ клеток.

Полученные результаты позволяют предполагать, что увеличение включения ^3H -тимидина в ДНК Pb^{2+} -обработанных спленоцитов по сравнению с интактными клетками не является кальмодулин-зависимым процессом.

Данные о влиянии хлорпромазина на синтез ДНК в спленоцитах на стадии достоверного уменьшения включения ^3H -тимидина в ДНК Pb^{2+} -обработанных (100 мкМ) спленоцитов по сравнению с контролем представлены на диаграмме (рис. 4.2). Интересно отметить, что и после предварительной обработки клеток хлорпромазином наблюдается достоверное уменьшение включения ^3H -тимидина в ДНК Pb^{2+} -обработанных спленоцитов по сравнению с интактными клетками.

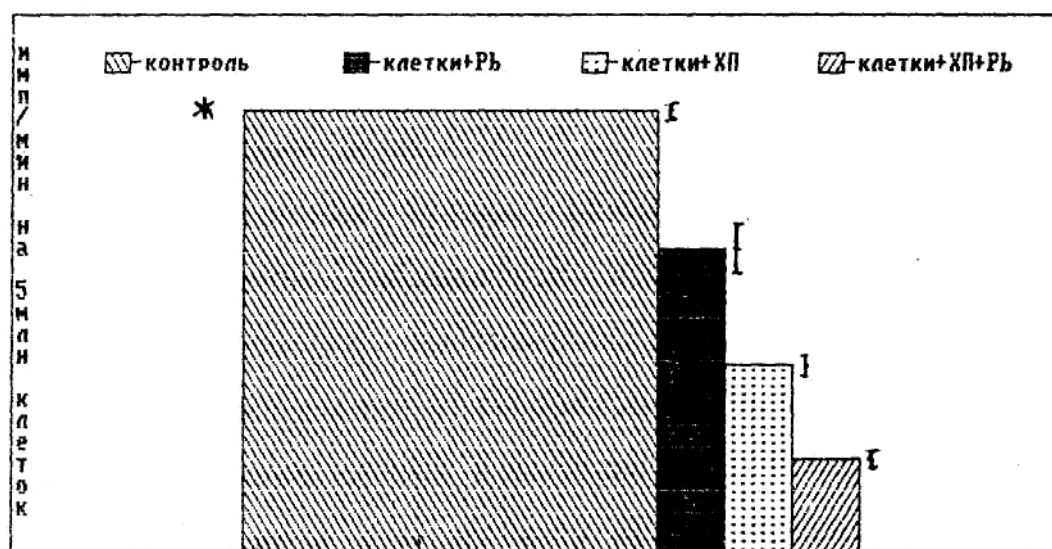


Рис. 4.2. Влияние хлорпромазина на синтез ДНК в спленоцитах на стадии достоверного уменьшения включения ^3H -тимидина в ДНК Pb^{2+} -обработанных спленоцитов

Свежеизолированные спленоциты ($5 \cdot 10^6$ клеток на 1 мл культуры) культивировали в среде 199. Такое же количество спленоцитов параллельно инкубировали с добавлением 100 мкМ ацетата свинца. Часть опытных и контрольных культур предварительно обрабатывали хлорпромазином (10 мкМ) в течение 60 мин. Затем в культуры вносили ^3H -тимидин (5 мкКи/мл) на весь период культивирования. Количество включенного ^3H -тимидина в ДНК спленоцитов оценивали по радиоактивности кислотоосаждаемого материала (см. главу 2). Горизонтальная ось — время культивирования спленоцитов составило 3 ч; вертикальная ось — количество включенного ^3H -тимидина в ДНК в импульсах в минуту на $5 \cdot 10^6$ клеток.

На рисунке 4.3 представлены данные о влиянии хлорпромазина на включение ^3H -уридина в РНК интактных и Pb^{2+} -обработанных (100 мкМ) спленоцитов.

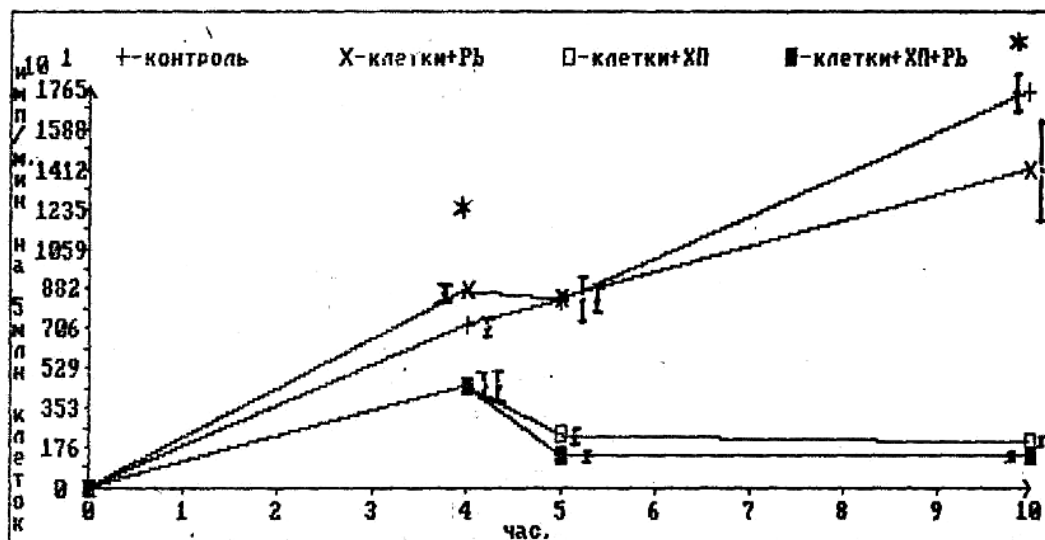


Рис. 4.3. Влияние хлорпромазина на кинетику включения ^3H -уридина в РНК интактных и Pb^{2+} -обработанных спленоцитов

Свежеизолированные спленоциты ($5 \cdot 10^6$ клеток на 1 мл культуры) культивировали в среде 199. Такое же количество спленоцитов параллельно инкубировали с добавлением 100 мкМ ацетата свинца. Часть опытных и контрольных культур предварительно обрабатывали хлорпромазином (10 мкМ) в течение 60 мин. Затем в культуры вносили ^3H -уридин (5 мкКи/мл) на весь период культивирования. Синтез РНК прерывали через 4, 5 и 10 ч (см. главу 2). Кислотоосаждаемую фракцию собирали на мембранных фильтрах (Millipore, Англия) и определяли радиоактивность на жидкостном сцинтилляционном счётчике «Beckman» (США). Ось абсцисс — время культивирования спленоцитов (час); ось ординат — количество включенного ^3H -уридина в РНК в импульсах в минуту на $5 \cdot 10^6$ клеток.

Анализ кинетических кривых показывает, что к 4-му ч культивирования клеток наблюдается достоверное увеличение, а к 10-му ч, наоборот, достоверное уменьшение включения ^3H -уридина в РНК Pb^{2+} -обработанных спленоцитов по сравнению с интактными клетками. Преинкубация клеток в течение 1 ч с хлорпромазином снимает повышенное к 4-му ч культивирования включение радиоактивных предшественников РНК Pb^{2+} -обработанных спленоцитов.

Эти данные позволяют сделать вывод о том, что Pb^{2+} -индуцированное увеличение включения радиоактивной метки в РНК спленоцитов является кальмодулин-зависимым процессом.

Обработка клеток хлорпромазином, как и следовало ожидать, приводит к значительному угнетению транскрипционной активности в интактных и Pb^{2+} -обработанных спленоцитах в течение всего периода культивирования. Важно отметить также прогрессирующее уменьшение доли новосинтезированных «хлорпромазин-устойчивых» РНК по мере увеличения длительности пульсовой метки. Так, их доля в интактных и Pb^{2+} -обработанных спленоцитах к 4-му ч культивирования соответственно составляет 63,5 и 51,0 %, к 5-му ч — 30,0 и 17,0 % и к 10-му ч — 14,5 и 10,0 %. Как следует из данных, представленных на рисунке 4.3, такой характер кинетики включения 3H -уридина в РНК интактных и Pb^{2+} -обработанных спленоцитов, преинкубированных с хлорпромазином, обусловлен угнетением синтеза и прогрессирующим распадом новосинтезированных РНК. Более выраженное уменьшение доли «хлорпромазин-устойчивых» РНК в Pb^{2+} -обработанных спленоцитах, несомненно, является отражением специфического РНК-деполимеризующего влияния ионов свинца, проявляющегося на поздних этапах культивирования клеток.

На рисунке 4.4 представлены данные о влиянии хлорпромазина на включение ^{14}C -аминокислот в белки интактных и Pb^{2+} -обработанных (100 мкМ) спленоцитов.

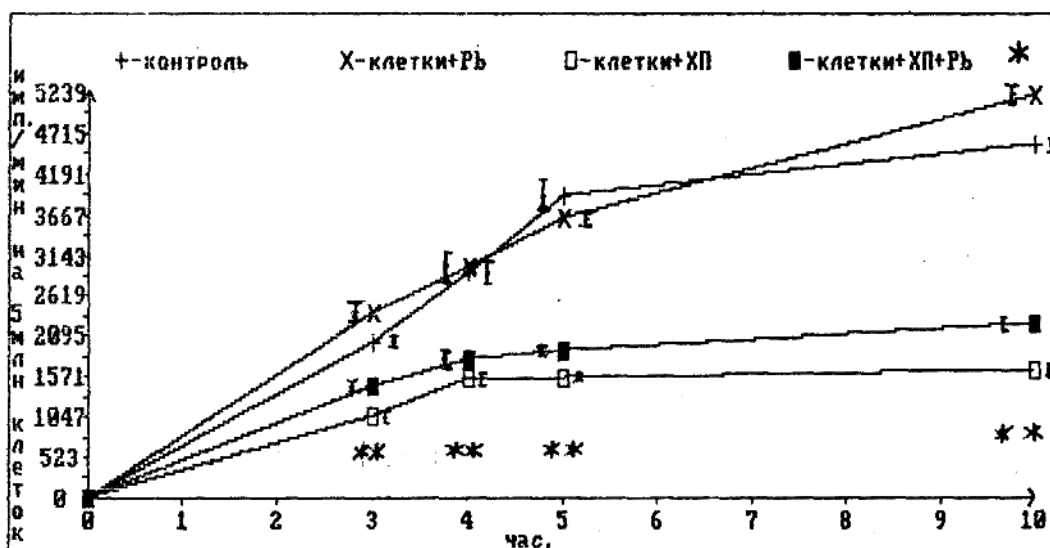


Рис. 4.4. Влияние хлорпромазина на кинетику включения ^{14}C -аминокислот в белки интактных и Pb^{2+} -обработанных спленоцитов

Свежеизолированные спленоциты ($5 \cdot 10^6$ клеток на 1 мл культуры) инкубировали в среде 199. Такое же количество спленоцитов параллельно инкубировали с добавлением 100 мкМ ацетата свинца. После 60-минутной преинкубации части контрольных и опытных культур с хлорпромазином (10 мкМ) в культуры вносили ^{14}C -гидролизат белков хлореллы на весь период культивирования. Синтез прерывали через 3, 4, 5, и 10 ч. Количество включенного радиоактивного предшественника оценивали по радиоактивности кислотоосаждаемого материала (см. главы 2). На горизонтальной оси — время культивирования спленоцитов (час), на вертикальной оси — количество включенных ^{14}C -аминокислот в белки в импульсах в минуту на $5 \cdot 10^6$ клеток.

Видно, что к 10-му ч культивирования клеток наблюдается достоверное увеличение включения ^{14}C -аминокислот в белки Pb^{2+} -обработанных спленоцитов по сравнению с контрольными клетками. Преинкубация клеток с хлорпромазином резко ускоряет наступление этого эффекта. Так, активация синтеза белка в Pb^{2+} -обработанных спленоцитах, преинкубированных с хлорпромазином, наблюдается уже через 2 ч культивирования клеток и сохраняется в течение всего периода культивирования клеток. Такое изменение характера кинетики синтеза белка под влиянием ацетата свинца в клетках, обработанных хлорпромазином, свидетельствует о том, что наблюдаемая активация синтеза белка не является кальмодулин-зависимым процессом. Более того, приведенные выше данные позволяют предположить, что кальмодулин, наоборот, играет негативную роль в процессе активации синтеза белка в Pb^{2+} -обработанных спленоцитах. Механизм такой негативной регуляции неясен.

Степень угнетения синтеза белка в интактных и Pb^{2+} -обработанных спленоцитах под влиянием хлорпромазина составляет соответственно к 4-му ч культивирования 46,5 и 60,0 %; к 5-му ч — 60,3 и 48,0 %; к 10-му ч — 63,5 и 57,0 %.

На наш взгляд, особого внимания заслуживает факт значительного несоответствия между степенью угнетения включения ^3H -уридина в РНК (90 %) и синтеза белка (57 %) хлорпромазином в Pb^{2+} -обработанных спленоцитах к 10-му ч культивирования клеток. Другими словами, включение ^{14}C -аминокислот в белки является гораздо большим, чем следовало бы ожидать из данных по включению ^3H -уридина в РНК Pb^{2+} -обработанных спленоцитов, преинкубированных с хлорпромазином. По-видимому, в этом несоответствии проявляется общая стратегия клетки на пути преодо-

ления катастрофической ситуации, навязанной ей экспериментом, заключающаяся в активации предсуществующих в цитоплазме клеток стабильных долгоживущих мРНК и, возможно, в использовании предсуществующих первичных транскриптов различных типов мРНК. Это предположение хорошо согласуется с данными о том, что актиномицин Д в эукариотических клетках вызывает быстрое угнетение синтеза РНК [81], но постепенное снижение синтеза белка [214].

4.4. ВЛИЯНИЕ АЦЕТАТА СВИНЦА НА ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ УРОВЕНЬ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ И ПРОСТАГЛАНДИНОВ В СПЛЕНОЦИТАХ КРЫС

Циклические нуклеотиды являются ведущим эффекторным звеном, опосредующим влияние на клетку различных физических и химических факторов. Поэтому понятен интерес к изучению роли циклических нуклеотидов в механизме цитотоксического действия соединений свинца. В литературе имеются единичные сведения о влиянии ионов свинца на метаболизм циклических нуклеотидов в иммунокомпетентных клетках. Так, опыты *in vitro* на нейтрофилах крыс показали, что свинец активирует фосфодиэстеразу циклических нуклеотидов также эффективно, как кальций, и только в присутствии кальмодулина [230].

Полученные нами данные (табл. 4.4) свидетельствуют о том, что культивирование спленоцитов крыс в присутствии ацетата свинца в концентрации 100 мкМ сопровождается увеличением внутриклеточного уровня цАМФ, обнаруживаемого через 30 мин инкубации; концентрация цГМФ в течение всего периода инкубации клеток остается неизменной.

Таблица 4.4

Динамика изменения внутриклеточной концентрации цАМФ и цГМФ (пкМоль/10⁷ клеток) в Pb²⁺-обработанных спленоцитах

Время культивирования	цАМФ		цГМФ	
	контроль	опыт	контроль	опыт
30 мин	2,58 ± 0,28 (4)	4,33 ± 0,43* (4)	0,49 ± 0,08 (4)	0,73 ± 0,1 (3)
6 ч	1,63 ± 0,15 (6)	2,38 ± 0,27* (5)	0,65 ± 0,05 (6)	0,94 ± 0,14 (5)

Является ли обнаруженное нами стойкое и выраженное повышение внутриклеточного уровня цАМФ важным, по крайней мере, для проявления рассматриваемых в данной работе изменений интенсивности макромолеку-

лярных биосинтетических процессов в спленоцитах под влиянием ионов свинца, или это повышение необходимо для осуществления каких-либо других функций клетки однозначно сказать трудно. В любом случае можно полагать, что в интимных механизмах цитотоксического действия ионов свинца на спленоциты крыс существенную роль играют цАМФ-зависимые процессы.

Касаясь возможных причин повышения внутриклеточного уровня цАМФ в спленоцитах под влиянием ионов свинца, можно предположить два механизма. Во-первых, ионы свинца, проникая внутрь клетки, могут образовывать активный Pb^{2+} -кальмодулиновый комплекс, активирующий аденилатциклазу. Во-вторых, не исключено и прямое ингибирующее действие ионов Pb^{2+} на SH-содержащий фермент — фосфодиэстеразу циклических нуклеотидов [1].

В настоящее время доказано, что существенное влияние на регуляцию клеточного метаболизма совместно с Ca^{2+} -кальмодулиновой системой, циклическими нуклеотидами оказывают и простагландины.

В литературе имеются обширные сведения о влиянии ионов тяжелых металлов на биосинтез простагландинов. Так, Nugteren и соавт. [186] показали, что ионы Cu^{2+} , Zn^{2+} и Cd^{2+} ингибируют синтез простагландинов группы E в концентрациях менее 10 мкМ, а добавление G-SH снижает их ингибирующее действие. Deby и соавт. [112] обнаружили ингибирующее действие ионов золота и серебра в концентрации 1–10 мкМ на биосинтез ПГЕ₂ и ПГФ_{2α} с использованием в качестве фермента микросомальной фракции семенных пузырьков быка.

Интересно проследить мнение различных авторов о роли Cu^{2+} в процессе биосинтеза простагландинов. Oesterling и соавт. [187] отмечают, что ионы Cu^{2+} являются ингибитором процесса энзиматического биосинтеза простагландинов как ионы тяжелого металла. Tobias и соавт. [226], наоборот, установили, что ионы Cu^{2+} , введенные в среду биосинтеза, увеличивают выход ПГФ_{2α}.

Наиболее убедительное объяснение влиянию ионов Cu^{2+} дает Maddox [167]. Он считает, что Cu^{2+} активирует эндопероксидазомеразу, причем данное действие Cu^{2+} протекает во времени. Именно этим объясняется избирательное увеличение выхода простагландинов группы F за счет уменьшения выхода простагландинов группы E.

Следует также отметить, что нельзя рассматривать роль ионов тяжелых металлов в биосинтезе простагландинов в отрыве от ко-факторов, например, глутатиона [206].

В свете приведенных данных значительный интерес представляет исследование влияния ацетата свинца на уровень простагландинов в спленоцитах крыс (табл. 4.5).

Таблица 4.5

Динамика изменения внутриклеточной концентрации простагландинов (пкг/10⁷ клеток) в Pb²⁺-обработанных (100 мкМ) спленоцитах крыс

Время культивирования	ПГЕ ₂		ПГФ _{2α}	
	контроль	опыт	контроль	опыт
30 мин	15,2 ± 2,4 (4)	5,7 ± 0,6* (6)	44,6 ± 4,7 (4)	196,5 ± 26,8* (6)
6 ч	6,9 ± 0,21 (4)	4,95 ± 0,27 (4)	24,95 ± 1,2 (4)	34,7 ± 5,0 (6)

Видно, что после 30-минутного контакта спленоцитов крыс с ацетатом свинца (100 мкМ) в них достоверно снижен уровень ПГЕ₂, и повышен уровень ПГФ_{2α} по сравнению с интактными клетками. При увеличении времени культивирования спленоцитов до 6 ч не обнаружено достоверных различий в уровне содержания ПГЕ₂ и ПГФ_{2α} в Pb²⁺-обработанных и интактных клетках.

Следует отметить, что соотношение концентраций ПГФ_{2α}/ПГЕ₂ в контроле остается постоянным в течение всего периода инкубации клеток и равно ~ 3. При этом соотношение уровней ПГФ_{2α}/ПГЕ₂ в Pb²⁺-обработанных спленоцитах изменяется в процессе увеличения длительности культивирования клеток с ~ 33 после 30-минутной инкубации до ~ 7 после 6 ч культивирования спленоцитов. При оценке влияния ацетата свинца на спленоциты во времени обращает на себя внимание факт значительного падения первоначально повышенного уровня содержания ПГФ_{2α} в Pb²⁺-обработанных спленоцитах, а также выравнивание до контрольного уровня первоначально пониженной концентрации ПГЕ₂.

Оценивая приведенные выше изменения внутриклеточного уровня простагландинов на начальном этапе культивирования спленоцитов с ионами Pb²⁺, можно, как и в случае с ионами Cu²⁺, предположить увеличение выхода простагландинов группы F за счет уменьшения выхода простагландинов группы E [167], что, по-видимому, является характерным для проявления раннего цитотоксического действия ионов тяжелых металлов.

4.5. ВЛИЯНИЕ 2-МЕРКАПТОЭТАНОЛА НА ИНТЕНСИВНОСТЬ ВКЛЮЧЕНИЯ РАДИОАКТИВНЫХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ В ДНК И РНК Pb²⁺-ОБРАБОТАННЫХ СПЛЕНОЦИТОВ

Нами установлено, что культивирование спленоцитов в присутствии ацетата свинца сопровождается активацией процессов перекисного окисления липидов. С этих позиций становится ясной оправданность применения антиоксидантов для коррекции нарушений клеточного гомеостаза, вызываемых ионами свинца. Обрыва свободнорадикальных реакций и предупреждения повреждения мембран можно добиться путем введения низкомолекулярных тиолов, участвующих в разложении гидроперекисей [12].

Кроме того, согласно упоминаемой ранее традиционной точке зрения, механизм токсического действия соединений свинца основан на связывании ионов свинца с сульфгидрильными группами белков и низкомолекулярных соединений и изменении таким образом активности многих ферментных систем [18]. Наиболее надежным критерием правильности тех или иных представлений о механизме того или иного патологического процесса является возможность его предупреждения и лечения. Химическая патология в этом отношении не является исключением.

Учитывая вышеизложенное, нам представлялось целесообразным изучить влияние 2-меркаптоэтанола (МКЭ) на интенсивность включения ³H-тимидина в ДНК и ³H-уридина в РНК Pb²⁺-обработанных спленоцитов крыс (табл. 4.6).

Таблица 4.6

Влияние 2-меркаптоэтанола на включение ³H-тимидина в ДНК и ³H-уридина в РНК Pb²⁺-обработанных спленоцитов крыс

Условия эксперимента	Включение радиоактивных предшественников, имп/мин	
	ДНК	РНК
Клетки	11193 ± 222	17848 ± 1049
Клетки + 100 мкМ МКЭ	10681 ± 349	16569 ± 848
Клетки + 100 мкМ Pb(CH ₃ COO) ₂	6164 ± 649*	14953 ± 1528*
Клетки + 100 мкМ МКЭ + 100 мкМ Pb(CH ₃ COO) ₂	9413 ± 361**	20174 ± 2949**

Примечание: * — различия по сравнению с контролем достоверны (P < 0,05); ** — различия достоверны по отношению к клеткам + 100 мкМ Pb(CH₃COO)₂ (P < 0,05).

С одной стороны видно, что добавление 2-меркаптоэтанола в среду культивирования в концентрации 100 мкМ не оказывает влияния на количество включенных радиоактивных предшественников в ДНК и РНК интактных клеток. С другой стороны, одновременное добавление в среду культивирования 2-меркаптоэтанола (100 мкМ) и ацетата свинца (100 мкМ) снижает ингибирующее влияние ацетата свинца на включение радиоактивных предшественников в ДНК и РНК спленоцитов крыс.

Можно полагать, что выраженный защитный эффект МКЭ при токсическом влиянии ацетата свинца на спленоциты, по-видимому, обусловлен рядом причин. Во-первых, трудно исключить возможность ингибирующего влияния 2-меркаптоэтанола на процессы перекисного окисления липидов в результате восполнения убыли природных антиоксидантов. Во-вторых, возможно, под влиянием 2-меркаптоэтанола происходит реин активация SH-содержащих ферментов. И, наконец, определенную роль в защитном эффекте 2-меркаптоэтанола, несомненно, играют его комплексообразующие свойства, вызывающие связывание ионов свинца.

Таким образом, на основании представленных выше данных можно сделать следующие выводы.

Ионы свинца вызывают активацию процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в спленоцитах крыс, что является отражением общих механизмов цитотоксического действия ксенобиотиков. Активацию глутатионредуктазы и увеличение внутриклеточного пула восстановленного глутатиона на ранней стадии взаимодействия ионов свинца с иммунокомпетентными клетками можно рассматривать как защитную реакцию, предохраняющую спленоциты от действия избытка перекисей и свободных радикалов. При длительном культивировании спленоцитов с ацетатом свинца наблюдается истощение компенсаторных защитных механизмов, что проявляется снижением активности глутатионредуктазы и содержания восстановленного глутатиона.

Начальная фаза токсического действия ионов свинца на спленоциты, выражающаяся в увеличении включения радиоактивных предшественников в ДНК и РНК, не зависит от трансмембранного потока ионов кальция. Внеклеточные ионы кальция проявляют защитное действие на синтез нуклеиновых кислот при длительном культивировании спленоцитов с ацетатом свинца.

Данные, полученные в опытах с использованием хлорпромазина, свидетельствуют о различной роли кальмодулина в кинетике включения радиоактивных предшественников в ДНК, РНК и белок под влиянием аце-

тата свинца в спленоцитах крыс. Так, если Pb^{2+} -индуцированное увеличение включения радиоактивных предшественников в ДНК спленоцитов не зависит от кальмодулина, то для РНК этот эффект является кальмодулин-зависимым.

По-видимому, одним из механизмов развития раннего цитотоксического действия ионов свинца может быть увеличение выхода простагландинов группы F за счет уменьшения выхода простагландинов группы E. Цитотоксическое действие ионов свинца на спленоциты крыс, вероятно, осуществляется посредством цАМФ и $PGF_{2\alpha}$ -зависимых процессов.

2-Меркаптоэтанол оказывает выраженный защитный эффект на ингибирующее влияние ацетата свинца на синтез ДНК и РНК в спленоцитах крыс, что свидетельствует о важной роли внутриклеточных SH-содержащих соединений в генезе цитотоксического действия ионов свинца на иммунокомпетентные клетки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Описанные в монографии экспериментальные данные дают возможность суммировать представления о взаимодействии ацетата свинца с иммунокомпетентными клетками, выделить фазность его цитотоксического влияния, а также оценить роль ПОЛ, Ca^{2+} -кальмодулиновой системы, системы циклических нуклеотидов и простагландинов в генезе нарушений макромолекулярных биосинтетических процессов в спленоцитах, индуцируемых ионами свинца.

Судя по опытам *in vitro* с включением ^3H -тимидина в ДНК спленоцитов, концентрация ацетата свинца, равная 1 мкМ, является нетоксичной [29].

Доказано, что ацетат свинца в концентрации 10–100 мкМ оказывает существенное влияние на синтез ДНК, РНК и белка в спленоцитах [26, 29, 31]. Важно отметить, что обнаруженные изменения синтеза ДНК и РНК носят фазный характер [26, 29]. Так, на начальных этапах культивирования клеток в присутствии ацетата свинца наблюдается достоверное увеличение включения радиоактивных предшественников в ДНК и РНК Pb^{2+} -обработанных спленоцитов по сравнению с контролем [31, 60]. В случае с ДНК это увеличение может быть обусловлено как активацией синтеза ДНК, так и стабилизирующим влиянием ионов свинца на структуру макромолекулы ДНК [31]. Уместно напомнить, что в литературе имеются сведения о стимуляции синтеза ДНК ацетатом свинца в печени и почках крыс [103, 114], а также о стабилизирующем влиянии ионов свинца на структуру ДНК [220].

Наблюдаемая на начальном этапе культивирования клеток фаза увеличения включения ^3H -уридина в РНК Pb^{2+} -обработанных спленоцитов также может быть обусловлена как активацией синтеза РНК, так и уменьшением скорости распада новосинтезированной РНК в результате стабилизирующего эффекта ионов свинца на структуру макромолекулы и (или) угнетения рибонуклеаз [14, 54, 91, 204].

Отмечено, что увеличение длительности культивирования спленоцитов с ацетатом свинца приводит к нивелированию описанного выше эффекта, а затем наступает фаза уменьшения включения ^3H -тимидина и ^3H -уридина в ДНК и РНК Pb^{2+} -обработанных спленоцитов по сравнению с контролем [26, 29, 31, 60]. Последняя фаза может быть обусловлена, с одной стороны, угнетением синтеза ДНК и РНК, возможно, вследствие ингибирования ацетатом свинца ДНК- и РНК-полимераз [127], а с другой стороны, увеличением скорости распада новосинтезированных молекул в

результате специфического взаимодействия ионов свинца с нуклеиновыми основаниями, дестабилизирующего структуру макромолекулы ДНК [220] или специфической реакции деполимеризации РНК под влиянием ионов свинца [122].

При изучении влияния ацетата свинца на синтез быстрометящихся РНК в спленоцитах крыс установлено, что на стадии повышенного включения ^3H -уридина в общую клеточную РНК Pb^{2+} -обработанных спленоцитов интенсивность синтеза тотальной бмРНК не изменена по сравнению с интактными клетками, однако обнаружены разнонаправленные изменения синтеза различных типов бмРНК [34, 62]. Так, синтез 45S пре-рРНК (которая, по нашим данным, составляет $\sim 50\%$ от общего пула бмРНК) достоверно угнетен, а синтез суммарного пула гяРНК + пре-тРНК + актиномицин-устойчивая РНК, наоборот, активирован по сравнению с интактными спленоцитами [62]. Учитывая полученные нами данные о том, что доля актиномицин-устойчивой РНК среди бмРНК в Pb^{2+} -обработанных спленоцитах не изменена по сравнению с таковой в интактных и составляет $\sim 7\%$ [62], а также литературные данные, что гяРНК составляет не более 1% от общей клеточной РНК [55], можно полагать, что увеличение включения ^3H -уридина в общую клеточную РНК спленоцитов, обработанных ацетатом свинца, с одной стороны, обусловлено активацией ионами свинца синтеза и накопления в цитоплазме новосинтезированной тРНК, а с другой стороны, связано с уменьшением скорости распада новосинтезированной РНК в результате стабилизации структуры макромолекулы и (или) угнетения активности рибонуклеаз, что следует из результатов пульс-чейз-экспериментов с использованием актиномицина Д [26, 34, 62].

На стадии уменьшения включения ^3H -уридина в общую клеточную РНК наблюдается угнетение РНК-синтетической активности и синтеза всех типов бмРНК [34]. Эти результаты свидетельствуют в пользу представлений об общетоксическом действии ацетата свинца на клетки при длительном культивировании Pb^{2+} -обработанных спленоцитов. Несомненно, уменьшение количества включенного ^3H -уридина в РНК связано как с РНК-деполимеризирующим действием ионов свинца, что следует из результатов пульс-чейз-экспериментов с использованием актиномицина Д [26, 34, 62], так и непосредственно с угнетением синтеза РНК.

В опытах *in vivo* установлено, что в динамике свинцового отравления также наблюдается фазный характер изменений синтеза ДНК, РНК и белка в спленоцитах опытных животных [25].

При введении крысам ацетата свинца в дозе 5 мг Pb^{2+} /кг ежедневно внутрибрюшинно в течение 20 суток наблюдается достоверное увеличение включения радиоактивных предшественников в ДНК, РНК и белок спленоцитов опытных животных на 10-е сутки эксперимента по сравнению с контролем [25, 35]. В основе этого увеличения могут лежать не только механизмы, описанные в опытах *in vitro*. Известно, что попадая в организм, ионы свинца образуют соединения с белками [48], формируя новые и чуждые для организма антигены, способные активировать иммунокомпетентные клетки [140, 141], сенсibiliзируя организм в целом.

По-видимому, этот механизм является причиной того, что за последнее десятилетие чрезвычайно возросла частота аллергических заболеваний, вызываемых химическими соединениями тяжелых металлов, и это привело к необходимости выделять их в особую группу аллергических болезней — металлоаллергозов [48].

Интересен тот факт, что увеличение синтеза белка в спленоцитах опытных животных не зависит от синтеза рРНК *de novo* [62]. Если бы активация синтеза белка была обусловлена синтезом рРНК *de novo*, то в присутствии актиномицина Д (0,15 мкг/мл) не наблюдалось бы активации синтеза белка.

К 20-м суткам свинцовой интоксикации наблюдается угнетение синтеза РНК и белка в спленоцитах опытных крыс [25, 35], что является проявлением общетоксического эффекта ионов свинца.

На наш взгляд, заслуживает также особого внимания факт значительного несоответствия между степенью угнетения синтеза РНК (~ на 82 %) и синтеза белка (~ на 44 %) в спленоцитах опытных крыс на 20-е сутки свинцовой интоксикации. Иными словами, включение ^{14}C -аминокислот в белки является гораздо большим, чем следовало бы ожидать из данных по угнетению синтеза РНК в спленоцитах опытных крыс [60]. По-видимому, в этом несоответствии проявляется общая стратегия клетки на пути преодоления катастрофической ситуации, навязанной ей экспериментом, заключающаяся в активации предсуществующих в цитоплазме клеток стабильных долгоживущих мРНК и, возможно, в использовании предсуществующих первичных транскриптов различных типов РНК.

Использование в экспериментах высокой дозы ацетата свинца (25 мг Pb^{2+} /кг) в качестве «внезапного химического удара», приводящее к значительному увеличению общего клеточного свинца, резко сокращает время, необходимое для достижения общетоксического действия ионов

свинца, что проявляется угнетением всех макромолекулярных биосинтетических процессов в спленоцитах опытных крыс уже на 3-ьи сутки эксперимента [25, 35]. Интересно, что в данном случае наблюдается практически полное соответствие между степенью угнетения синтеза РНК и белка в спленоцитах опытных крыс. Очевидно, что при сильном «химическом ударе» клетка не успевает перестроить свой метаболизм на использование предсуществующих в цитоплазме стабильных долгоживущих мРНК или предсуществующих первичных транскриптов различных типов РНК.

Последующее содержание животных на общем рационе вивария в течение 18 суток, сопровождающееся резким снижением общего клеточного свинца, приводит к достоверному увеличению включения радиоактивных предшественников в ДНК и РНК опытных животных по сравнению с контролем [25, 35].

Таким образом, последствия взаимодействия ацетата свинца с иммунокомпетентными клетками являются довольно сложными и в значительной степени варьируют в зависимости от дозы и продолжительности его действия. Обнаруженный нами фазный характер изменений синтеза ДНК и РНК в спленоцитах крыс под влиянием ацетата свинца в опытах *in vitro* и *in vivo* указывает на необходимость проведения именно кинетических исследований при оценке влияния соединений свинца на интенсивность макромолекулярных биосинтетических процессов.

Особый интерес для понимания и расшифровки молекулярных механизмов модифицирующего влияния ацетата свинца на биосинтетические макромолекулярные процессы имеют данные по исследованию ПОЛ, кальций-кальмодулиновой системы, циклических нуклеотидов и простагландинов.

Весьма оригинальные, на наш взгляд, данные получены при исследовании роли ПОЛ в цитотоксическом действии ионов свинца на спленоциты крыс. Доказано, что ионы свинца оказывают модифицирующее влияние на интенсивность (активацию) процессов перекисления липидов, что можно рассматривать как признак общей неспецифической реакции на воздействие ксенобиотика [30].

Особая роль в функционировании системы детоксикации как механизма гомеостаза и резистентности отводится глутатиону и связанным с ним ферментным системам [56]. Так как глутатион и глутатионредуктаза занимают центральное место в антирадикальной и антиперекисной защите организма, то активацию глутатионредуктазы и увеличение внутриклеточ-

точного пула восстановленного глутатиона на ранней стадии взаимодействия ионов свинца со спленоцитами можно рассматривать как защитную реакцию, повышающую резистентность клеток к токсическому действию ацетата свинца. При длительном культивировании спленоцитов с ацетатом свинца наблюдается снижение активности глутатионредуктазы и концентрации восстановленного глутатиона, что, по-видимому, является отражением истощения компенсаторных защитных механизмов клеток [30].

Рассматривая модифицирующее влияние ионов свинца на ПОЛ в свете гипотезы свободнорадикальной регуляции процессов роста и размножения клеток [6], можно выдвинуть предположение о том, что активация перекисного окисления липидов под влиянием ионов свинца является одним из важнейших триггерных механизмов перевода спленоцитов из одного метаболического состояния в другое.

Учитывая антиоксидантное действие тиоловых соединений [5], на следующем этапе работы нами было проведено исследование влияния 2-меркаптоэтанола на интенсивность макромолекулярных биосинтетических процессов в Pb^{2+} -обработанных спленоцитах.

Доказано, что использование 2-меркаптоэтанола (100 мкМ) снимает ингибирующее влияние ацетата свинца (100 мкМ) на включение радиоактивных предшественников в ДНК и РНК спленоцитов крыс. Полученные результаты свидетельствуют в пользу представлений о важной роли сульфгидрильных соединений в механизмах токсического действия ацетата свинца на спленоциты. Защитное действие 2-меркаптоэтанола может быть обусловлено, с одной стороны, хелатированием ионов свинца 2-меркаптоэтанолом, а с другой — обрывом свободнорадикальных реакций [27].

Приведенные выше результаты и соображения оправдывают возможность патогенетически обоснованного использования низкомолекулярных тиолов в качестве протекторов от повреждающего воздействия на клетку ионов свинца.

В работе проведен анализ влияния дефицита внеклеточного кальция на проявление цитотоксического эффекта ацетата свинца на спленоциты крыс [32]. Наличие стадии повышенного включения 3H -тимидина и 3H -уридина в ДНК и РНК Pb^{2+} -обработанных спленоцитов как в кальциевой, так и бескальциевой средах свидетельствуют о том, что трансмембранные потоки ионов Ca^{2+} не играют существенной роли в возникновении этого эффекта. При рассмотрении кинетики включения радиоактивных предшественников в ДНК и РНК спленоцитов с 5-го по 10-й ч культивирования клеток обращает на себя внимание тот факт, что при наличии

кальция в среде культивирования наблюдается достоверное увеличение включения радиоактивных меток в ДНК и РНК как интактных, так и Pb^{2+} -обработанных спленоцитов. Удаление же Ca^{2+} из культуральной среды нивелирует этот эффект, а в случае с РНК даже приводит к достоверному уменьшению включения 3H -уридина в РНК Pb^{2+} -обработанных спленоцитов [32].

Результаты этих исследований однозначно позволяют отвергнуть теорию общего конечного Ca^{2+} -индуцированного пути гибели клеток при воздействии ацетата свинца, которая связана с различными биохимическими изменениями в клетках под влиянием высокой внутриклеточной концентрации свободных ионов Ca^{2+} , возникающей в результате избыточного поступления их внутрь клеток при изменении проницаемости клеточных мембран. Более того, полученные нами данные исследований цитотоксического действия ацетата свинца на спленоциты, культивируемые в кальциевой и бескальциевой средах, свидетельствуют о защитной роли внеклеточных ионов Ca^{2+} при воздействии ацетата свинца на макромолекулярные биосинтетические процессы в иммунокомпетентных клетках [28, 32]. Эти представления о защитной функции ионов кальция при воздействии соединений свинца находят подтверждение в литературе. Так, увеличение содержания кальция и фосфора в рационе цыплят оказывает защитное действие при свинцовой интоксикации [2]. Нервно-мышечная блокада, вызываемая соединениями свинца, снимается ионами кальция [211]. Эффект влияния ионов свинца на симпатическую передачу в периферической нервной системе также является обратимым по отношению к ионам Ca^{2+} [156].

Данные, полученные в опытах с использованием хлорпромазина — ингибитора кальмодулина, свидетельствуют о различной роли кальмодулина в кинетике включения радиоактивных предшественников в ДНК, РНК и белок под влиянием ацетата свинца. Так, Pb^{2+} -индуцированное увеличение включения радиоактивных предшественников в ДНК спленоцитов не зависит от кальмодулина, а для РНК этот эффект является кальмодулин-зависимым. Более выраженное уменьшение доли «хлорпромазин-устойчивых» РНК в Pb^{2+} -обработанных спленоцитах, несомненно, является отражением специфического РНК-деполимеризирующего влияния ионов свинца, проявляющегося на поздних этапах культивирования клеток [28].

Обращает на себя внимание факт значительного несоответствия между степенью угнетения включения 3H -уридина в РНК (90 %) и синтеза

белка (57 %) хлорпромазином в Pb^{2+} -обработанных спленоцитах к 10-му ч культивирования клеток. Эти данные служат ещё одним доказательством ранее высказанного нами предположения, что в условиях токсического воздействия ацетата свинца клетки способны синтезировать белки, используя предсуществующие первичные транскрипты различных типов мРНК, а также путем активации предсуществующих в цитоплазме стабильных долгоживущих мРНК [28].

Установлено, что культивирование спленоцитов в присутствии ацетата свинца (100 мкМ) в течение 6 ч сопровождается увеличением внутриклеточного уровня цАМФ, обнаруживаемого уже через 30 мин инкубации; концентрация цГМФ в течение всего периода инкубации клеток остается неизменной [22, 33]. Эти данные находятся в полном соответствии с представлениями о том, что активация аденилатциклазной системы является первичным звеном в ответной реакции клеток на действие повреждающих агентов [58].

Биологические эффекты цАМФ, как известно, обусловлены активацией протеинкиназ [46, 170]. В аспекте рассматриваемой в данной работе проблемы состояния макромолекулярных биосинтетических процессов при взаимодействии иммунокомпетентных клеток с ацетатом свинца значительный интерес представляют данные о модулирующем влиянии цАМФ-зависимых протеинкиназ на активность РНК-полимераз [66, 95]. Важно также отметить, что цАМФ в иммунокомпетентных клетках является посредником фрагментации ДНК [219]. Инкубация изолированных тимоцитов с агентами, повышающими внутриклеточное содержание цАМФ, стимулирует фрагментацию ДНК. Активность фрагментирующей ДНК-эндонуклеазы в тимоцитах модулируется цАМФ-зависимой протеинкиназой [170].

Учитывая приведенные выше данные, можно предположить, что цитотоксическое действие ионов свинца на спленоциты крыс опосредуется через цАМФ-зависимые реакции [28, 33]. Вероятно, увеличение внутриклеточной концентрации цАМФ в Pb^{2+} -обработанных спленоцитах может быть одним из факторов, обуславливающих повышенное включение 3H -уридина в РНК на начальных этапах культивирования клеток. Несомненно, стойкое и длительное повышение внутриклеточного уровня цАМФ в спленоцитах под влиянием ацетата свинца стимулирует фрагментацию ДНК, что вносит определенный вклад в снижение включения 3H -тимидина в ДНК на поздних этапах культивирования клеток [28, 33].

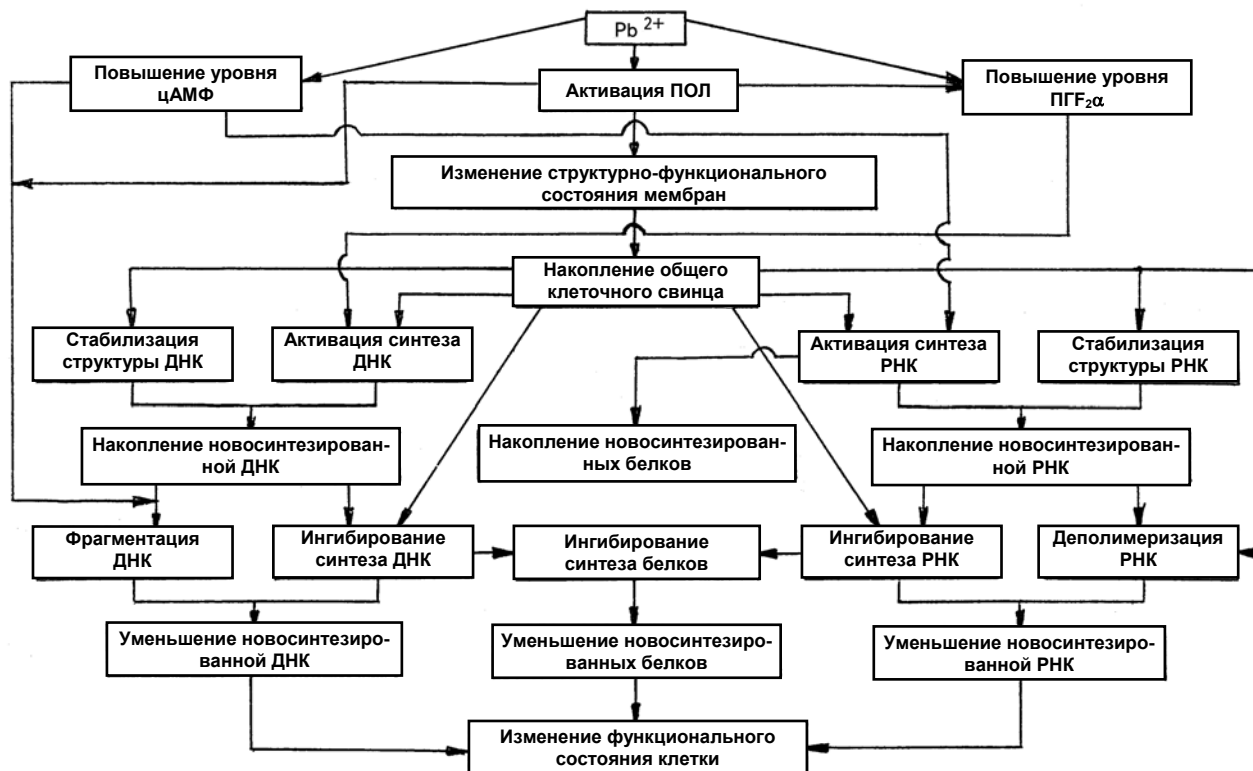
В последнее время широкое подтверждение получают данные о том, что простагландины участвуют в регуляции функционального состояния клеток. Конкретные механизмы их действия на функциональную активность клеток практически не изучены, однако, в ряде случаев доказано, что простагландины регулируют синтез ДНК [59, 150, 225].

Поэтому понятен интерес к полученным нами данным о влиянии ацетата свинца на уровень простагландинов в спленоцитах, согласно которым на ранних этапах культивирования клеток наблюдается достоверное снижение концентрации ПГЕ₂ и увеличение ПГФ_{2α} в Pb²⁺-обработанных спленоцитах по сравнению с интактными клетками [22, 28, 33]. Нами выдвигается предположение, что, как и в случае с соединениями меди [167], цитотоксический эффект ионов свинца на начальных этапах культивирования клеток проявляется увеличением выхода простагландинов группы F за счет уменьшения выхода простагландинов группы E. Увеличение содержания ПГФ_{2α} на начальных этапах культивирования клеток может быть одним из факторов, обуславливающих повышенное включение ³H-тимидина в ДНК Pb²⁺-обработанных спленоцитов [151].

Схема на рисунке представляет собой попытку резюмировать изложенные выше экспериментальные данные о молекулярных механизмах токсического влияния ацетата свинца на спленоциты крыс и показывает, что взаимодействие ионов свинца с клетками приводит к трем наиболее существенным сдвигам, составляющим, на наш взгляд, ключевое (первое) звено процесса: к активации процессов перекисного окисления липидов, увеличению внутриклеточной концентрации цАМФ и ПГФ_{2α}, и, наконец, к структурно-функциональной реорганизации клеточных мембран, сопровождающейся накоплением общего клеточного свинца (второе звено).

Всё это на начальных этапах взаимодействия ионов свинца со спленоцитами приводит к увеличению включения радиоактивных предшественников в ДНК, РНК и белок (третье звено), что может быть обусловлено, с одной стороны, активацией макромолекулярных биосинтетических процессов, а с другой — стабилизацией структуры ДНК и РНК ионами свинца. При длительном культивировании, а также при сильном «химическом ударе» в опытах *in vivo*, приводящих к значительному накоплению общего клеточного свинца, наблюдается уменьшение включения радиоактивных предшественников в ДНК, РНК и белок (четвертое звено), что обусловлено как ингибированием синтеза макромолекул, так и цАМФ-зависимой фрагментацией ДНК и РНК-деполимеризующим действием

ионов свинца. В итоге, в результате значительного уменьшения в клетках новосинтезированных ДНК, РНК и белков, спленоциты изменяют свое функциональное состояние, характеризующееся угнетением важнейших для жизнеспособности клеток макромолекулярных биосинтетических процессов (пятое звено).



Гипотетическая схема цитотоксического действия ионов свинца на спленоциты крыс

Таким образом, на основании всего вышеизложенного, можно сделать вывод о том, что ионы свинца являются «возмущающими» факторами внешней среды, которые, вмешиваясь в молекулярные механизмы функционирования биологических систем, нарушают нормальный ход метаболизма в спленоцитах, что приводит к сдвигам гомеостаза на клеточном уровне. Ионы свинца оказывают влияние на основные характеристики спленоцитов, включая процессы синтеза и накопления новосинтезированных ДНК, РНК и белка, функционирование мембран, интенсивность ПОЛ, внутриклеточную концентрацию циклических нуклеотидов и простагландинов, определяющих функциональную активность иммунокомпетентных клеток. Степень и характер нарушения клеточного гомеостаза зависит от интенсивности и продолжительности действия ионов свинца.

Литература

1. *Ажгихин, И. С.* Простагландины / И. С. Ажгихин. М.: Медицина. 1978. 405 с.
2. *Андрушайте, Р. Е.* Взаимодействие свинца и Са-Р-обмена и витамина Д // Регуляция фосфор-кальциевого обмена в норме и патологии / Р. Е. Андрушайте. Рига. 1987. С. 53–65.
3. *Апростолов, И.* Активность лизосомальных ферментов в сыворотке крови при экспериментальной интоксикации свинцом / И. Апростолов, З. Запрянов, В. Гылыбова // Бюлл. эксп. биол. и мед. 1976. № 9. С. 1070–1071.
4. *Балаж, А.* Эндогенные ингибиторы клеточной пролиферации : пер. с англ. / А. Балаж, И. Блажек. М.: Мир. 1982. 302 с.
5. *Бергельсон, Л. Д.* Биологические мембраны / Л. Д. Бергельсон. М.: Медицина. 1973. 247 с.
6. *Бурлакова, Е. Б.* Роль липидов в процессе передачи информации в клетке / Е. Б. Бурлакова // Биохимия липидов и их роль в обмене веществ : сб. ст. М. 1981. С. 23–34.
7. *Бушинская, Л. И.* Сравнительное исследование обмена сиалогликопротеидов и активности лизосомальных ферментов при различных биологических эффектах некоторых химических факторов окружающей среды : автореф. дис. канд. биол. наук / Л. И. Бушинская. М. 1979.
8. *Венкстерн, Т. В.* Биосинтез транспортных рибонуклеиновых кислот / Т. В. Венкстерн // Успехи биол. химии. 1976. Т. 17. С. 3–25.
9. *Верболович, В. П.* Особенности активности цитохромоксидазы и определение гемоглобина при свинцовом отравлении / В. П. Верболович // Тр. Казанского института краевой патологии АН СССР. 1965. Вып. 14. С. 71–80.
10. *Геник, Ф. А.* Накопление Pb и С1 в почве городских зеленых насаждений / Ф. А. Геник // Весці АН БССР. Сер. біял. навук. 1987. № 6. С. 14–17.
11. *Гигиенические критерии состояния окружающей среды. Т. 3. Свинец* // Совмест. изд. прогр. ООН по окружающей среде и Всемир. орг. здравоохран. ВОЗ, Женева. 1980. 193 с.
12. *Голиков, С. Н.* Общие механизмы токсического действия / С. Н. Голиков, И. В. Саноцкий, Л. А. Титунов. М.: Медицина. 1986. 276 с.
13. *Голиков, С. Н.* Опыт применения системного подхода к классификации токсических веществ / С. Н. Голиков, И. С. Бадюгин // Всес. учр. конф. по токсикол. : тез. докл. М. 1980. С. 192–193.
14. *Голубович, Е. Я.* Влияние свинца на интенсивность обмена РНК в клеточных фракциях семенников белых крыс / Е. Я. Голубович, Р. Л. Орлянская // Токсик. нов. промышл. хим. вещ. М.: Медицина. 1975. Вып. 14. С. 22–25.
15. *Гончаренко, М. С.* Метод оценки перекисного окисления липидов / М. С. Гончаренко, А. И. Латинава // Лаб. дело. 1985. № 1. С. 60–61.
16. *Дарнелл, Д. Э.* Процессинг РНК / Д. Э. Дарнелл // В мире науки. 1983. № 12. С. 36–47.
17. *Ежкова, Т. С.* Изменение некоторых показателей защиты организма в динамике свинцового отравления / Т. С. Ежкова, Н. Н. Тихонов, Г. С. Шеремет // Гигиен. вопр. производства цветных металлов в Казахстане. Алма-Ата. 1987. С. 120–128.
18. *Ершов, Ю. А.* Механизмы токсического действия неорганических соединений / Ю. А. Ершов, Т. В. Плетенева. М.: Медицина. 1989. 271 с.

19. *Влияние* острой интоксикации солями некоторых тяжелых металлов на НАДФ·Н-зависимое перекисное окисление липидов / М. Кадийска [и др.] // Гигиена и здравоохранение. 1984. Т. 27, № 6. С. 536–541.

20. *Ковалевский, А. Л.* Особенности накопления свинца живыми организмами / А. Л. Ковалевский // Микроэол. в биологии и их примен. в с/х и мед. : тез. докл. XI Всес. конф. Самарканд. 1990. С. 38–39.

21. *Костенко, М. Н.* Ионная регуляция дифференцировки и регенерации нейронов в культуре / М. Н. Костенко // Усп. совр. биологии. 1980. Т. 90, № 2(5). С. 201–235.

22. *Котова, Т. В.* Влияние ацетата свинца на содержание циклических нуклеотидов и простагландинов в спленоцитах крыс / Т. В. Котова, Е. В. Барковский // Бел. биохимическое о-во. Актуал. пробл. совр. биохимии : сб. материалов городск. конф. 1991. С. 22.

23. *Кузнецова, Н. В.* Включение ³Н-уридина в разные типы быстрометящихся РНК крови и лимфы крупного рогатого скота в норме и при лимфолейкозе / Н. В. Кузнецова, Н. В. Николаева, Б. З. Иткин // Теоретич. и практ. вопр. ветеринарии. Тарту. 1978. С. 114–120.

24. *Ладриган, Ф.* Современные проблемы эпидемиологии и токсикологии профессионального воздействия свинца (обзор литературы) / Ф. Ладриган // Гигиена тр. и проф. заболев. 1991. № 6. С. 25–27.

25. *Латушко, Т. В.* Влияние свинцовой интоксикации на интенсивность макромолекулярных биосинтетических процессов в спленоцитах крыс / Т. В. Латушко // Влияние химических и медикаментозных препаратов на структурно-функциональные системы организма : сб. науч. тр. 1992. С. 104–107.

26. *Латушко, Т. В.* Влияние ацетата свинца на синтез РНК в спленоцитах крыс / Т. В. Латушко, Е. В. Барковский // Влияние химических и медикаментозных препаратов на структурно-функциональные системы организма : сб. науч. тр. 1992. С. 107–114.

27. *Латушко, Т. В.* Влияние 2-меркаптоэтанола на активность включения радиоактивных предшественников в ДНК и РНК Pb²⁺-обработанных спленоцитов / Т. В. Латушко // Актуал. пробл. биологии и мед. : сб. тр. сотрудн. МГМИ. Мн. 1996. Т. 1. С. 85–86.

28. *Латушко, Т. В.* Роль кальций-кальмодулиновой системы, циклических нуклеотидов и простагландинов в механизмах цитотоксического действия соединений свинца / Т. В. Латушко, Е. В. Барковский // Науч.-исслед. клинич. инст. радиационной медицины и эндокринологии. «Микроэлементные нарушения и здоровье детей Беларуси после катастрофы на Чернобыльской АЭС». Мн. 1997. С. 92–94.

29. *Латушко, Т. В.* Влияние ацетата свинца на синтез ДНК в спленоцитах крыс / Т. В. Латушко // Тр. молод. уч. Мн.: МГМИ. 1998. С. 176–179.

30. *Латушко, Т. В.* Роль перекисного окисления липидов в механизмах цитотоксического действия ацетата свинца / Т. В. Латушко, Е. В. Барковский, В. Г. Цыганков // Предпатология: проблемы и решения : сб. науч. тр. Мн.: Беларуская навука. 2000. С. 344–347.

31. *Латушко, Т. В.* Изменение синтеза ДНК в иммунокомпетентных клетках под влиянием ионов свинца / Т. В. Латушко, В. Г. Цыганков, Е. В. Барковский // Здоровье и окружающая среда : сб. науч. тр. Мн. 2001. С. 212–217.

32. *Латушко, Т. В.* Роль внеклеточных ионов кальция в цитотоксическом действии ацетата свинца / Т. В. Латушко, Е. В. Барковский, В. Г. Цыганков // Здоровье и окружающая среда : сб. науч. тр. Мн. 2001. С. 217–221.

33. *Латушко, Т. В.* Влияние ацетата свинца на внутриклеточный уровень циклических нуклеотидов и простагландинов в спленоцитах крыс / Т. В. Латушко, Е. В. Барковский // Актуал. вопр. совр. мед. : материалы юб. науч. конф., посвящ. 80-летию БГМУ. Ч. I. Мн. 2001. С. 255–257.

34. *Латушко, Т. В.* Влияние ацетата свинца на РНК-синтетическую активность и стабильность бмРНК в спленоцитах крыс / Т. В. Латушко, Е. В. Барковский, В. Г. Цыганков // Здоровье и окруж. среда : сб. науч. тр., посвящ. 75-летию НИИ санитарии и гигиены. Т. 1. Барановичи: РУПП «Барановичская укр. типография». 2002. С. 538–541.

35. *Латушко, Т. В.* Изменение синтеза белка в иммунокомпетентных клетках при свинцовой интоксикации / Т. В. Латушко, Е. В. Барковский // Ксенобиотики и живые системы : материалы II-й Международной науч. конф. Мн. 2003. С. 165–168.

36. *Лукашев, А. А.* О профилактике сатурнизма в металлургии свинца / А. А. Лукашев, В. Э. Зингер // Гиг. тр. и проф. заболев. 1987. № 10. С. 40–43.

37. *Любченко, П. Н.* Активность дегидрогеназы АЛК в организме крыс при свинцовом отравлении / П. Н. Любченко, Ю. З. Острун, Б. Н. Гладышев // Гиг. тр. и проф. заболев. 1980. № 4. С. 51–52.

38. *Макашев, К. К.* Обменные процессы при сатурнизме / К. К. Макашев. Алма-Ата. 1976.

39. *Мамбеева, А. А.* Изменение реактивности тонкого кишечника здоровых и отравленных свинцом животных к гистамину под влиянием растворов уксуснокислой соли свинца / А. А. Мамбеева, А. С. Ахмедова // Бюлл. экспер. биологии. 1967. Т. 64. С. 34–37.

40. *Мерcuryева, Р. В.* Обмен сиалосодержащих гликопротеидов и активность ферментов лизосом при нейротропном эффекте некоторых химических факторов окружающей среды / Р. В. Мерcuryева, Л. И. Бушинская // Укр. биохим. журн. 1981. Т. 53, № 6. С. 31–35.

41. *Монаенкова, А. М.* Изменения сердечно-сосудистой системы при некоторых хронических интоксикациях промышленными ядами (свинец, сероуглерод, бензол) / А. М. Монаенкова, К. В. Глотова // Гиг. тр. и проф. заболев. 1969. № 11. С. 32–36.

42. *Неорганическая биохимия* / под ред. Г. Эйхгорна. М.: Мир. 1978. Т. 2. 736 с.

43. *Новиков, Д. К.* Клеточные методы иммунодиагностики / Д. К. Новиков, Д. И. Новикова. Мн.: Беларусь. 1979. 222 с.

44. *Плюснин, А. З.* Низкомолекулярные ядерные РНК / А. З. Плюснин, А. П. Козлов // Успехи совр. биологии. 1979. Т. 88. С. 322–336.

45. *Поспелова, Т. В.* Действие актиномицина Д на клеточную пролиферацию, индуцированную в лимфоцитах человека фитогемаглютинином / Т. В. Поспелова // Цитология. 1975. Т. 17, № 6. С. 660–666.

46. *Преображенская, Н. П.* Современные представления о роли цАМФ как регулятора активности ферментов / Н. П. Преображенская, А. М. Юркевич // Вопр. мед. химии. 1973. XIX, № 5. С. 457–462.

47. *Пруденко, О. В.* Загрязнение свинцом воздуха и почвы большого города / О. В. Пруденко, Т. В. Колесников, Г. М. Ефремова // В сб.: Свинец в окружающей среде ; под ред. Г. И. Сидоренко. М. 1978. С. 5–8.

48. *Металлоаллергозы* / Ж. Ж. Раппопорт [и др.]. Изд-во Красноярского университета. 1987. 176 с.

49. *Расмуссен, Г.* Циркуляция кальция и внутриклеточная передача внешних сигналов / Г. Расмуссен // В мире науки. 1989. № 12. С. 36–43.

50. *Роттенберг, Ю. С.* Классификация ксенобиотиков по локализации их действия на ферментные системы митохондрий / Ю. С. Роттенберг // Бюлл. эксп. биологии и мед. 1982. № 9. С. 42–45.

51. *Семенова, Л. П.* Соотношение ДНК, РНК, гистонов и негистоновых белков в ядерных фракциях лимфоцитов лимфы крупного рогатого скота в норме и при лимфолейкозе / Л. П. Семенова, Н. В. Николаева, О. Ф. Беспалько // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1974. № 6. С. 922–925.

52. *Сидоренко, Г. И.* Состояние и перспектива теоретических исследований в гигиене / Г. И. Сидоренко // Вестн. АМН СССР. 1976. № 12. С. 74–82.

53. *Соколов, В. В.* Клеточные и субклеточные реакции в изучении влияния на организм малых концентраций токсических веществ / В. В. Соколов, И. А. Грибова, Л. А. Иванова // Гиг. тр. и проф. заболеваний. 1981. № 7. С. 5–8.

54. *Срочинский, Я.* Цитохимические исследования базофильной зернистости эритроцитов при отравлении свинцом / Я. Срочинский // Гиг. тр. и проф. заболеваний. 1966. № 4. С. 41.

55. *Тарантул, В. З.* Гетерогенная ядерная РНК: структура и функция / В. З. Тарантул, К. Г. Газарян // Усп. биологической химии. 1982. Т. 22. С. 26–62.

56. *Титунов, Л. А.* Исследование многокомпонентной системы детоксикации в печени белых крыс / Л. А. Титунов, В. И. Касаткин, В. А. Иванова // Бюлл. экспер. биологии и мед. 1985. № 3. С. 361–364.

57. *Трахтенберг, И. М.* Современные представления о воздействии ртути на клеточные мембраны / И. М. Трахтенберг, Л. А. Иванова // Гиг. и сан. 1984. № 5. С. 59–63.

58. *Федоров, Н. А.* Биологическое и клиническое значение циклических нуклеотидов / Н. А. Федоров. М.: Медицина. 1979. 183 с.

59. *Цудзевич, Б. А.* Влияние экзогенных простагландинов на интенсивность фосфорилирования белков хроматина и синтез ДНК в пролиферирующих гепатоцитах / Б. А. Цудзевич, С. Е. Кучеренко, И. Б. Блюм // V Всес. биох. съезд. М.: Наука. 1986. Т. 2. С. 135.

60. *Цыганков, В. Г.* Изменение синтеза РНК под влиянием ионов свинца в иммунокомпетентных клетках / В. Г. Цыганков, Т. В. Латушко, Е. В. Барковский // Здоровье и окружающая среда : сб. науч. тр. Мн. 2001. С. 393–397.

61. *Цыганков, В. Г.* Негативные эффекты действия свинца на организм (обзор) / В. Г. Цыганков, Т. В. Латушко, Ю. Л. Горбич // Здоровье и окружающая среда : сб. науч. тр., посвящ. 75-летию НИИ санитарии и гигиены. Т. 2. РУПП «Барановичская укр. типография». 2002. С. 447–464.

62. *Цыганков, В. Г.* Некоторые показатели метаболизма РНК в Pb²⁺-обработанных спленоцитах крыс / В. Г. Цыганков, Т. В. Латушко, Е. В. Барковский // Здоровье и окружающая среда : сб. науч. тр., посвящ. 75-летию НИИ санитарии и гигиены. Т. 2. РУПП «Барановичская укр. типография». 2002. С. 468–473.

63. *Чекунова, М. П.* Ферменты лизосом и острые повреждения миокарда промышленными ядами / М. П. Чекунова // Структура и функции лизосом : тез. докл. Международного симпозиума. М. 1976. С. 160–161.

64. *Шабалин, В.* «Три кита» эндоэкологии / В. Шабалин // Мед. газета. 1992. № 94. С. 6.

65. *Штернберг, А. И.* Роль свинца как фактора, воздействующего через пищу на внутреннюю среду организма / А. И. Штернберг, Г. Н. Заева // Вестн. АМН СССР. 1978. № 3. С. 78–82.

66. *Яворская, В. К.* цАМФ-связывающие белки растений и их возможная роль в регуляции процессов клеточного деления / В. К. Яворская, Ф. Л. Калинин, И. В. Драгозов // Клеточ. цикл раст. в онтогенезе. Киев. 1988. С. 82–90.

67. *Яковлев, А. Н.* Результаты исследования загрязненности атмосферы города свинцом и бенз(а)пиреном, выбрасываемым автотранспортом / А. Н. Яковлев // Гиг. и сан. 1991. № 1. С. 9–12.

68. *Abbound, C. N.* The requirements for ionized calcium and magnesium in lymphocyte proliferation / C. N. Abbound, S. P. Scully, A. H. Lichtman // [Univ. Rochester Sch. Med. Dentistry, Rochester, NY, 14642. US] J. Cell. Physiol. 1985. Vol. 122, № 1. P. 64–72.

69. *Alomran, A. H.* The influence of chronic lead exposure on lymphocyte proliferative response and immunoglobulin levels in a storage battery workers / A. H. Alomran, M. N. Shleamoon // J. Biol. Sci. Res. 1988. Vol. 19, № 3. P. 575–586.

70. *Attardi, G.* Structure and synthesis of ribosomal RNA / G. Attardi, F. Amaldi // Annu. Rev. Biochem. 1970. Vol. 39. P. 183.

71. *Lead poisoning* / J. C. Aub [et al.] // Baltimore, Williams and Wilkins Co. 1956. Vol. 7. P. 206.

72. *Relationship of community levels of air lead and indices of lead absorption* / A. Arar [et al.] // In Proceedings of the International Symposium; Environmental Health Aspects of Lead, Amsterdam, 2–6 October. 1972. P. 581–594.

73. *Baginski, B.* Einflub von Blei, Zink und Cadmium auf die zelltoxische Wirkung humaner polymorphkerniger Leukozyten am Beispiel von Hefezellen / B. Baginski, B. Grube // Zentralbe. Hyg. und Umweltmed. 1991. Vol. 191, № 1. P. 28–35.

74. *Baginski, B.* Einflub von Blei und Cadmium auf die Vitamita und Phagozytosefahigkeit humaner polymorphkerniger Leukozyte / B. Baginski // Zbl. Bacteriol. 1985. Abt. IB. Vol. 181, № 6. P. 461–468.

75. *Bansal, M. R.* Effect of oral leadacetate administration on the mouse brain / M. R. Bansal, N. Kaushal, U. C. Banerjee // J. Trace Elem. Exp. Med. 1990. Vol. 3, № 3. P. 235–246.

76. *Barltrop, D.* Lead binding to haemoglobin / D. Barltrop, A. Smith // Experientia (Basel). 1972. Vol. 27. P. 92–95.

77. *Barry, P. S.* A comparison of concentrations of lead in human tissues / P. S. Barry // Brit. J. Ind. Med. 1975. Vol. 32. P. 119–139.

78. *Barry, P. S.* Lead concentrations in human tissues / P. S. Barry, D. B. Mossman // Brit. J. Ind. Med. 1970. Vol. 27. P. 339–351.

79. *Chromosome aberrations in lymphocytes after occupational exposure to lead and cadmium* / M. Bauchinger [et al.] // Mutat. Res. 1976. Vol. 40. P. 57–62.

80. *Berger, S. L.* Studies on mRNA in resting and growing lymphocytes / S. L. Berger, C. S. Birkenmeier // Cell Biology and Immunology of Leucocyte Function (Ed. M. R. Quastel) Academic Press. 1979. P. 121–127.

81. *Berger, S. Z.* Studies on mRNA in resting and growing lymphocytes / S. Z. Berger, C. S. Birkenmeier // Cell Biology and Immunology of leucocyte function. New York, San Francisco, London. 1979. P. 121–27.

82. *Beritic, T.* Lead concentration found in human blood in association with lead colic / T. Beritic // Arch. Environ. Health. 1971. Vol. 23. P. 289–291.

83. *Bochev, P.* Metal-induced development of lipid peroxidation in liposomes / P. Bochev // Sci Works Higher Med. Inst. Pleven. 1985. Vol. 7, № 1. P. 32–37.

84. *Borella, P.* Cadmium, nickel, chromium and lead accumulate in human lymphocytes and interfere with PHA-induced proliferation / P. Borella, S. Manni, A. Giardino // J. Trace Elem. and Electrolytes Health and Diseases. 1990. Vol. 4, № 2. P. 87–95.

85. *Borle, A. B.* Control, modulation and regulation of cell calcium / A. B. Borle // Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology. 1981. Vol. 90. P. 13–71.

86. *Borsook, H.* Factors affecting protein synthesis in vitro in rabbit reticulocytes / H. Borsook, E. Y. Fisher, G. Keighley // J. Biol. Chem. 1957. Vol. 229, № 2. P. 1059–1070.

87. *Boudene, C.* Etude des taux de plomb dans l'air et dans la population en France. In: International Symposium on Environmental Lead Research, Dubrovnik, 14–15 May. 1975 / C. Boudene, F. Arsac, J. Meininger // Arch. Industr. Hyg. Toxicol. Vol. 26. Supplement. P. 179–189.

88. *Boynton, A. L.* Calmodulin stimulates DNA synthesis by rat liver cells / A. L. Boynton, J. F. Whitfield, J. P. MacManus // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1980. Vol. 95, № 2. P. 745–749.

89. *Contradictory* effects of low level of lead exposure on behaviour: hyperactivity from initial stimulation later reverses to hypoactivity / M. Bradiey [et al.] // Heavy Metals Environ. Int. Conf., Heideberg Sept. 1983. P. 594–597.

90. *Brandhorst, B. P.* Stability of nuclear RNA in mammalian cells / B. P. Brandhorst, E. H. McCoukey // J. Mol. Biol. 1974. Vol. 85. P. 451.

91. *Brown, R. S.* Crystallographic and biochemical investigation of the lead(II)-catalyzed hydrolyses of yeast phenylalanine tRNA / R. S. Brown, J. C. Dewan, A. Klug // Biochemistry. 1985. Vol. 24. P. 4785–4801.

92. *Burguera, J. L.* Lead in roadside soils of Merida city, Venezuela / J. L. Burguera, M. Burguera // Sci. Total. Environ. 1988. Vol. 77, № 1. P. 45–49.

93. *Capeun, E.* Lead in petroi / E. Capeun, D. Petit, E. Picciotto // Endeavour. 1984. Vol. 8, № 3. P. 135–144.

94. *Chakraborty, I.* Effects of inorganic lead on cell division and nucleic acids in rats / I. Chakraborty, G. Talukder, A. Sharma // Proc. Nat. Acad. Sci. India. B. 1988. Vol. 58, № 2. P. 221–227.

95. *Chaudhary, K. D.* Brain transfer RNA. I. Methylation of newly synthesized tRNA / K. D. Chaudhary, L. Carrier-Malhotra, M. R. Murthy // Neurochem. Res. 1982. Vol. 7, № 1. P. 55–65.

96. *Cheung, W. I.* Calmodulin: its potential role in cell proliferation and heavy metal toxicity / W. I. Cheung // Fed. Proc. 1984. Vol. 43, № 15. P. 2995–2999.

97. *Cheung, W. I.* Discovery and recognition of calmodulin, a personal account / W. I. Cheung // J. Cycl. Nucleotide Res. 1981. Vol. 7, № 2. P. 71–84.

98. *Chisolm, J. J.* Aminoaciduria as a manifestation of renal tubular injury in lead intoxication and a comparison with patterns of aminoaciduria seen in other diseases / J. J. Chisolm // J. Pediatr. 1962. Vol. 60. P. 1–17.

99. *Contenuto* in metalli pesanti del latte umano / F. Chiti [et al.] // Bol. Chim. ig Parte Sci. 1984. Vol. 35, № 12. P. 445–452.

100. *Choi, D.* Cell proliferation in Mouse Kidney induced by lead / D. Choi, G. Richter // *Lab. Invest.* 1974. Vol. 30, № 5. P. 647–652.
101. *Chowdhurry, B. A.* Metal compounds and immunotoxicology / B. A. Chowdhurry, R. K. Chandra // *Metalls and Their Compounds Environ. Occurrence, Analysis, Biol. Relevance.* Weinheim etc. 1991. P. 605–615.
102. *Cohen, N.* Increased concanavalin A-induced supressor cell activity in humans with occupational lead exposure / N. Cohen, D. Modai, A. Golik // *Environ. Res.* 1989. Vol. 48, № 1. P. 1–6.
103. *Liver cell proliferation induced by a single dose of lead nitrate* / A. Columbano [et al.] // *Amer. J. Pathol.* 1983. Vol. 110. P. 83–88.
104. *Lead and Cadmium effects on host defense mechanisms and toxic interactions with bacterial endotoxin* / G. A. Cook [et al.] // *Reticuloendothelial Syst. Compr.* Great, New York; London. 1984. Vol. 7A. P. 379–400.
105. *Cooper, H. L.* Studies on RNA metabolism during lymphocyte activation / H. L. Cooper // *Transplant. Rev.* 1972. Vol. 11. P. 3–8.
106. *Renal ultrastructure renal function, and parameters of lead toxicity in workers with different period of lead exposure* / K. Cramer [et al.] // *Brit. J. Ind. Med.* 1974. Vol. 31. P. 113–127.
107. *Cramer, K.* Incidence of hypertension among lead workers / K. Cramer, L. Dahlberg // *Brit. J. Ind. Med.* 1966. Vol. 23. P. 101–104.
108. *Cross, M. E.* The transformation of lymphocytes by adenosino 3', 5'-cyclic monophosphate and consequent changes in histono microstructure / M. E. Cross, M. G. Ord // *Biochem J.* 1970. Vol. 120. P. 21–22.
109. *Cruteher, J. C.* Clinical manifistation and therapy of acute lead intoxication due to ingest- ion of illicitly distilled alcohol / J. C. Cruteher // *Ann. intern. Med.* 1963. Vol. 59. P. 707–715.
110. *Survey of lead and cadmium in human milk and correlation of levels with environmental and food factors* / R. W. Dabeka [et al.] // *Sci. Total. Environ.* 1988. Vol. 71, № 1. P. 65–66.
111. *Davies, B. E.* Lead in soll-how clean is clean? / B. E. Davies, B. G. Wixson // *Trace Subst. Environ. Health-XX: Proc. Univ. Mo. 20th Annu. Conf., Columbia, Mo., June 2–5.* 1986. P. 233–241.
112. *Deby, C.* In vitro inhibition of a prostaglandin by gold and silver / C. Deby, Z. Bacq, D. Simon // *Biochem. Pharmacol.* 1973. Vol. 22. P. 3141–3143.
113. *Deknudt, G.* Chromosome aberrations observed in male workers occupationally exposed to lead / G. Deknudt, A. Leonard, B. Ivanov // *Environ. Physiol. Biochem.* 1973. № 3. P. 132–138.
114. *Variations of Serum lipoproteins during cell proliferation induced by lead nitrate* / S. Dessi [et al.] // *Experim. and Molecular Patology.* 1989. Vol. 51, № 2. P. 97–102.
115. *Dimitrova, M.* Modifications of the contracticle function of the myocard in chronic lead poisoning / M. Dimitrova // *Arch. Mal. prof. Med. Trav.* 1972. Vol. 33. P. 383–387.
116. *Dingwall-Fordyce, J.* A follow-up study of lead workers / J. Dingwall-Fordyce, R. E. Lane // *Brit. J. Ind. Med.* 1963. Vol. 20. P. 313–320.
117. *Environmental contamination by lead from a mine and smelter; a preliminary Report* / D. Djuric [et al.] // *Arch. Environ. Health.* 1971. Vol. 23. P. 276–279.

118. *Durbor, C.* Selected data on public supplies of the 100 largest cities in the United States / C. Durbor, E. Becker // *J. Am. Works Assoc.* 1964. Vol. 56. P. 237–246.

119. *Egyhazi, E.* Regulation of the synthesis and the stability of ribosomal RNA during contact inhibition of growth / E. Egyhazi, Y. E. Edstrom // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1972. Vol. 46. P. 1551.

120. *Elinder, C. G.* Toxicity of metals / C. G. Elinder, E. Kessler // *Util. Sewage Sludge Land: Rate is Appl. and Long-Term Eff. Metals. Proc. Semin., Uppsala, June 7–9.* 1983. P. 116–125.

121. *Elwood, P. C.* The sources of lead in blood: a critical review / P. C. Elwood // *Sci. Total. Environ.* 1986. Vol. 52, № 1–2. P. 1–23.

122. *Farkas, W. R.* Depolymerization of ribonucleic acid by plumbous ion / W. R. Farkas // *Biochim. Biophys. Acta.* 1968. Vol. 155, № 2. P. 401–409.

123. *Fowler, B. A.* Compartmental binding of Pb in rat kidney mitochondria / B. A. Fowler, J. A. Taylor, A. Oskarsson // *Fed. Proc.* 1981. Vol. 40. P. 828–830.

124. *Chronic* low level lead toxicity in the rat. III. A toxicological assesment with special reference to the ridney / B. A. Fowler [et al.] // *Toxicol. appl. Pharmacol.* 1980. Vol. 56. P. 59–77.

125. *Fox, M. R.* Assessment of cadmium, lead and vanadium of large animals as related to the human food chain / M. R. Fox // *J. Anim. Sci.* 1987. Vol. 65, № 6. P. 1744–1752.

126. *Freeman, R.* Reversible myocarditis due to chronic lead poisoning in childhood / R. Freeman // *Arph. Dis. Child.* 1965. Vol. 40. P. 389–393.

127. *Frenkel, G. D.* Effects of lead acetate on DNA and RNA synthesis by intact Helva cells, isolated nuclei and purifild polymerases / G. D. Frenkel, C. Middleton // *Biochem. Pharmacol.* 1987. Vol. 36, № 2. P. 265–268.

128. *Gabor, S.* Effect of DMPS and DMSA on lead-induced lipid peroxidation in rat liver and kidney / S. Gabor, M. Botoc, A. Kovats // *Plzen. lek. sb.* 1988. Suppl. № 56. P. 133–136.

129. *Gajdos, A.* Erreur du diagnostique differentiel entre l'intoxication par le plombs et la porphyrie intermittente aique / A. Gajdos, M. Gajdos-Torok // In: *Proceedings of the International Symposium; Environmental Health Aspectsof Lead, Amsterdam, 2–6 October.* 1972. P. 501–505.

130. *Gasiorowski, K.* Polarographic and spectroscopic study on Pb (II) ion interaction with DNA / K. Gasiorowski, J. Swiatek, H. Kozlowski // *Inorg. Chim. Acta.* 1985. Vol. 106. P. 11–15.

131. *Giurgea, R.* Modifications in the liver and thymus of Wistar rats intoxicated with lead / R. Giurgea, I. Baba, J. Haller // *Rev. roum. biol. Ser. biol. anim.* 1989. Vol. 34, № 2. P. 113–115.

132. *Goldberg, A.* Lead poisoning and haem biosynthesis / A. Goldberg // *Brit. J. Haematol.* 1972. Vol. 23. P. 521–523.

133. *Goldberg, A.* Drinking water as a source of lead population / A. Goldberg // *Environ Health Perspect., Exp. Issue.* № 7. P. 103–107.

134. *Goldmith, J. R.* Respiratory exposure to lead epidemiological experimental dose-response relationships / J. R. Goldmith, A. C. Hexter // *Science.* 1976. Vol. 158. P. 132–134.

135. *Goyer, R. A.* Susceptibility to lead toxicity / R. A. Goyer, K. R. Mahaffey // *Environ. Health Perspect.* 1972. № 2. P. 73–80.

136. *Aminoaciduria* in Japanese workers in the lead and cadmium industries / R. A. Goyer [et al.] // *Am. J. Clin. Pathol.* 1972. Vol. 57. P. 635–642.
137. *Gueron, M.* Significance and mechanism of divalent-ion bending to transfer RNA / M. Gueron, J. L. Leroy // *Biophys. J.* 1982. Vol. 38, № 3. P. 231–236.
138. *Investigations* into ecological lead levels in children / T. Haas [et al.] // *Zbe. Bakt. Hyg I. Abt. Orig.* 1972. Vol. B 156. P. 353–360.
139. *Habermann, E.* Intracellular calcium binding proteins as targets for heavy metalloids / E. Habermann, G. Richardt // *Trends Pharmacol. Sci.* 1986. Vol. 7, № 8. P. 298–300.
140. *Specific* nuclear proteins generated by serum signals involved in lymphocyte stimulation / R. Haire [et al.] // *J. Cell. Biol.* 1984. Vol. 99, № 4. P. 333.
141. *Hall, D.* Early synthesis of specific cytoplasm proteins is correlated with the rate of exit of lymphocytes from the resting state / D. Hall, J. O'Leary, A. Rosenberg // *J. Cell. Biol.* 1984. Vol. 99, № 5. P. 1814–1821.
142. *Hammond, P. B.* Lead poisoning in cattle and horses in the vicinity of a smelter / P. B. Hammond, A. L. Aronson // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1964, III. P. 595–611.
143. *Hanigan, M. H.* Gammaglutamil transpeptidase — its role in hepatocarcinogenesis / M. H. Hanigan, H. C. Pitot // *Carcinogenesis.* 1985. Vol. 6, № 2. P. 165–171.
144. *Hedner, D.* Age-dependence of molecular and functional changes in biological membrane properties / D. Hedner // *Mechanisms aging and develop.* 1980. Vol. 14, № 1–2. P. 101–108.
145. *Effects* of cadmium and lead oxidative metabolism and phagocytosis by mouse peritoneal macrophages / U. Hilbertz [et al.] // *Toxicology.* 1986. Vol. 39, № 1. P. 47–57.
146. *Hitzfeld, B.* The effects of lead on protein and DNA metabolism of normal and lead-adapted rat kidney cells in culture / B. Hitzfeld, F. Planas-Bohne, D. Taylor // *Biological Trace Element Research.* 1989. Vol. 21. P. 87–95.
147. *Huber, H. C.* Einfache in vitro-Prüfsysteme zur Toxizitätsbestimmung von Umweltchemikalien. Mikrokulturen menschlicher Lymphozyten und monoxenische Ciliatenkulturen / H. C. Huber, W. Huber, U. Riffer // *Lentrabbl. Myg. und Umweltmed.* 1990. Vol. 189, № 6. P. 511–526.
148. *Izalt, R. M.* Sites and thermodynamic quantities associated with ribonucleic acid, deoxyribonucleic acid, and the constituent bases, nucleosides, and nucleotides / R. M. Izalt, J. J. Christensen, J. Rytting // *Chem. Rev.* 1971. Vol. 71, № 5. P. 439–481.
149. *Связь* между употреблением некоторых пищевых продуктов и концентрацией в крови свинца у рабочих, подвергающихся воздействию свинца / Y. Ito [et al.] // *J. Sci. Labour.* 1985. Vol. 61, № 6. P. 273–282.
150. *Jaward, A. M.* The effects of flurbiprofen and indomethacin on the mitogenic response of human peripheral mononuclear cells / A. M. Jaward, H. J. Rogers // *Immunopharmacology.* 1984. Vol. 7, № 1. P. 59–67.
151. *Jimenez, L. A.* An ordered sequence of temporal steps regulated the rate of DNA synthesis in cultured mouse cells / L. A. Jimenez // *Control Mechanism in animal cells*, Raven Press, New York. 1980. P. 173–197.
152. *Kaba, L.* Voltammetric study on the interaction of the heavy metals Cd(II) and Mn(II) with transfer RNA, DNA and other polynucleotides / L. Kaba, J. M. Sequaris, P. Valenta // *Toxic. Environ. Chem.* 1985. Vol. 10. P. 103–117.

153. *Kassenaar, A.* The incorporation of glycine globin and the synthesis of heme in vitro in duck erythrocytes / A. Kassenaar, H. Morell, I. U. London // *J. Biol. Chem.* 1957. Vol. 229. P. 423–435.

154. *Kay, W. W.* Цит. по Асатиани Б. С. Новые методы биохимической фотометрии / W. W. Kay, K. C. Murfitt. М. 1965. С. 158–159.

155. *Kopacz, U.* Weshalb “Benzinblei” giftig wirkt / U. Kopacz // *Techn. heute.* 1985. Vol. 38, № 6. P. 17.

156. *Kostial, K.* Lead ions and synaptic transmission in the superior cervical ganglion of the cat / K. Kostial, V. B. Vouk // *Brit. J. Pharmacol.* 1957. № 12. P. 219–220.

157. *Kozlovski, H.* Pulse polarographic studies on metal ion interaction with DNA / H. Kozlovski, T. Pavloyski, J. Swiatek // *Asian Journale Chem.* 1989. P. 93–104.

158. *Kuchars, E. J.* The effect of lead on protein and lectate dehydrogenase activity in hepatic slices cultured in vitro / E. J. Kuchars, B. Stawiarska-Pieta // *Arch. hid. rada i toksikol.* 1986. Vol. 37, № 2. P. 225–229.

159. *Labbe, R. F.* Lead poisoning mechanisms / R. F. Labbe // *Clin. Chem.* 1990. Vol. 36, № 11. P. 11.

160. *Lamm, S. H.* Lead contamination in milk fed to infants: 1972–1973 / S. H. Lamm, J. F. Rosen // *Pediatrics.* Vol. 53. P. 137–141.

161. *Epidemic lead absorbtion near an ore smelter; the role of particulate lead* / P. J. Landrigan [et al.] // *New Engl. J. Med.* 1975. Vol. 292. P. 123–129.

162. *Lead in tap water : a menace for millions* // *New Sci.* 1984. Vol. 104, № 1432. P. 821.

163. *Lessler, M. A.* Erythrocyte Osmotic fragility in the presence of Pb or Hg / M. A. Lessler, M I. Walters // *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 1973. Vol. 142. P. 548–553.

164. *Lison, D.* Comparison of the effects of awranofin, heavy metals and retinoids on protein kinase C in vitro and on a protein kinase C mediated response in macrophages / D. Lison, F. Raguzzi, R. Laywerys // *Pharmacol and Toxicol.* 1990. Vol. 67, № 3. P. 239–242.

165. *Loeb, L. A.* Metals and-Genetic Miscodingng: in Nucleic Acid-Metal Ion Interaction / L. A. Loeb, J. Zakour. New York. 1980. P. 115–144.

166. *Lowrey, K.* Rapid depression of rat liver mecosomal calcium pump activity after administration of carbon tetrachloride or bromtrichloromethane and lack of effect after ethanol / K. Lowrey, E. Glende, R. Recknagel // *Toxicol. a. Appl. Pharmacol.* 1981. Vol. 59, № 2. P. 389–394.

167. *Maddox, J. S.* The role of copper in prostaglandin biosynthesis / J. S. Maddox // *Biochim. Biophys. Acta.* 1973. Vol. 306. P. 74–81.

168. *Markovac, I.* Lead activates protein kinase C in immature rat brain microvessels / I. Markovac, C. Goldstein // *Toxicol. and Appl. Pharmacol.* 1988. Vol. 96, № 1. P. 14–23.

169. *Marks, P. A.* Protein synthesis in erythroid cells , i. reticulocyte ribosomes active in stimulating aminoacid incorporation / P. A. Marks, E. R. Burka, D. Schlessinger // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 1962. Vol. 48, № 12. P. 2163–2171.

170. *McConkey, D. J.* Agents that elevate cAMP stimulate DNA fragmentation in thymocytes / D. J. McConkey, S. Orrenius, M. Jondal // *J. Immunol.* 1990. Vol. 145, № 4. P. 1227–1230.

171. *Meyer, E.* Blei im Trinkwasser und Abhilfestrategien / E. Meyer // *Schrifterr. Ver. Wasser, Boden und Lufthyg.* 1987. № 74. P. 53–69.

172. *Michaell, L.* The immunosuppressive influence of industrial and environmental xenobiotics / L. Michaell, J. Rosenthal // Trends Pharmacol. Sci. 1986. Vol. 7, № 10. P. 408–412.
173. *Michaelson, J. A.* An improved model of lead induced brain dysfunction in the suckling rat / J. A. Michaelson, M. W. Sanerhoff // Toxicol. appl. Pharmacol. 1974. Vol. 28. P. 88–96.
174. *Mills, T. A.* The immunologic significance of antigen induced lymphocyte transformation in vitro / T. A. Mills // J. Immunol. 1966. Vol. 97, № 2. P. 239–247.
175. *Milroie, A.* Erythrocyte superoxide dismutase activity and other parameters of copper status in rats ingesting lead acetate / A. Milroie, H. Collins, C. Umbles // Toxicol. and Appl. Pharmacol. 1986. Vol. 82, № 3. P. 512–520.
176. *Mitchell, D. G.* Mass screening for lead poisoning, capillary blood sampling and automated Devels cup atomic absorption analysis / D. G. Mitchell, K. M. Aldous, F. J. Pyan // N. Y. State. J. Med. 1974. Vol. 74. P. 1599.
177. *Moore, M. R.* Haematological effects of lead / M. R. Moore // Sci. Total. Environ. 1988. Vol. 71, № 3. P. 419–431.
178. *Morris, H. W.* Variables associated with radioimmunoassay of prostaglandins in plasma / H. W. Morris, N. A. Sherman, F. T. Shepperdson // Prostaglandins. 1981. Vol. 21, № 5. P. 771–778.
179. *Mudziriski, D. V.* Analysis of lead effects on in vivo antibodymediated immunity in several mouse strains / D. V. Mudziriski, D. A. Lawrence // Toxicol. and Appl. Pharmacol. 1986. Vol. 83, № 2. P. 321–330.
180. *Muller, J.* Bleigehalte in und auf Lebensmitteln / J. Muller, P. Vteigert // LEBS Heffe. 1990. № 2. P. 1–214.
181. *Munter, K.* Inhibition of cellular activities by triethyllead. Role of glutathione and accumulation of triethyllead in vitro / K. Munter, M. Athanasiou, C. Stournaras // Biochem. Pharmacol. 1989. Vol. 38, № 22. P. 3941–3945.
182. *Murthy, G. M.* Cadmium, copper, iron, lead, manganese and zinc in evaporated milk, infant products and human milk / G. M. Murthy, U. S. Rhea // J. Paired Sci. Vol. 54. P. 1001–1005.
183. *Nakadawa, K.* Decreased glutathione S-transferase activity in mice livers by acute treatment with lead, independent of alteration in glutathione content / K. Nakadawa // Toxicol. Lett. 1991. Vol. 56, № 1–2. P. 13–17.
184. *Nicotera, P.* Ca²⁺-activated mechanisms in cell killing / P. Nicotera, D. J. McConkey, J. M. Dypbuck // Drug Metab. Rev. 1989. Vol. 20, № 24. P. 193–201.
185. *Niyogi, S. K.* Selective effects of metal ions on RNA synthesis rates / S. K. Niyogi, R. P. Feldman, D. J. Hoffman // Toxicology. 1981. Vol. 22, № 1. P. 9–21.
186. *Nugteren, D.* The enzymic conversion of all cis-8,11,14-linolenic acid into prostaglandin E₁ / D. Nugteren, B. Beerthuis, D. Dorp // Reel. Trav. Chim. 1966. Vol. 85. P. 405–409.
187. *Oesterling, T. O.* Prostaglandins / T. O. Oesterling, W. Morozovich, T. Roseman // J. Pharm. Sci. 1972. Vol. 61. P. 1861–1895.
188. *Orrenius, S.* Role of Ca²⁺ in toxic cell killing / S. Orrenius, D. J. McConkey, G. Bellomo // Trends Pharmacol. Sci. 1989. Vol. 10, № 7. P. 281–285.
189. *Induction of cerebral gliomas in rats with dietary lead subacetate and 2-acetylaminofluorene* / R. Oyasu [et al.] // Cancer Res. 1970. Vol. 30. P. 1248–1261.

190. *Palmisano, P. A.* Untaxed whisky and lead exposure / P. A. Palmisano, R. C. Sneed, G. Cassady // *I. Peditr.* 1969. Vol. 75. P. 869.

191. *Petermination* of organic and total lead in the atmosphere by atomic absorption spectrometry / L. J. Pardue [et al.] // *Anal. Chem.* 1973. Vol. 45. P. 527–530.

192. *Pawlowski, T.* Polarographic studies on copper (II) and nickel(II) ion interaction with DNA / T. Pawlowski, J. Swiatek, K. Gasiorowski // *Inorg. Chim. Acta.* 1897. Vol. 136. P. 185–189.

193. *Pegues, W. L.* Lead fume from welding on galvanized and zincsilicate coated steels / W. L. Pegues // *Ind. Hyg. J.* 1960. № 21. P. 252–255.

194. *Penman, S.* Localization and kinetics of formation of nuclear heterodisperse RNA, cytoplasmic heterodisperse RNA and polyribosome-associated messenger RNA in HeLa cells / S. Penman, C. Vesco, M. Pemnan // *J. Mol. Biol.* 1968. Vol. 34. P. 49.

195. *Perry, R. P.* Existence of methylated messenger RNA in mouse L cells / R. P. Perry, D. E. Kellet // *Cell.* 1974. Vol. 1, № 1. P. 37–44.

196. *Polliak, A.* Normal, transformed and leukemic leucocytes. A scanning electron microscope atlas / A. Polliak // Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag. 1977. 140 p.

197. *Pueschel, S. M.* A screening and follow up study of children with an increased lead burden / S. M. Pueschel, L. Kopito, H. Schwachman // *J. Am. Med. Assoc.* 1972. Vol. 333. P. 462–466.

198. *Rainteau, D.* Calmodulin in lymphocyte mitogenic stimulation and in lymphoid cell line growth / D. Rainteau, A. Sharef, R. Bourrillon // *Exp. Cell. Research.* 1987. Vol. 168. P. 546–554.

199. *Rampe, W.* Cd and Pb in the consumption of food stuffs depending on various contents of heavy metals / W. Rampe // *Process and Use Sewage Sinding Proc. 3 Int. Brighton*, Sept 27–30. 1983. P. 334–347.

200. *Rana, S. V.* Significance of lipid peroxidation in liver injury after heavy metal poisoning in rats / S. V. Rana, A. Rumar // *Curr. Sci (India).* 1984. Vol. 53, № 17. P. 933–934.

201. *Reuben, J.* Binding of manganese(II) to DNA and the competitive effects of metal ions and organic cations. An electron paramagnetic resonance study / J. Reuben, E. J. Gabbay // *Biochemistry.* 1975. Vol. 14. P. 1230–1235.

202. *Lead* contamination around secondary smelters: Estimation of dispersal and accumulation by humans / T. M. Roberts [et al.] // *Science.* 1974. Vol. 86. P. 1120–1123.

203. *Roderer, Gerhard.* Das Benzinbilibi und seine Angriffspunkte NeneEigenbnisse zum toxischen wirkunds mechanismus / Gerhard Roderer // *Mitt. Dtsch. Forschungsge-neinsch.* 1984. № 1. P. 13–14.

204. *Rubin, J. R.* RNA chain hydrolysis in phenylalanine t-RNA / J. R. Rubin, M. Sundaralingman // *J. Biol. Str. Dyn.* 1983. № 1. P. 639–646.

205. *Sabbioni, E.* Identification of lead-binding components in rat liver: in vitro study / E. Sabbioni, E. Mafarante // *Chem Biol. Int.* 1976. Vol. 15. P. 1–20.

206. *Samuelson, B.* Biosynthesis and metabolism of prostaglandins / B. Samuelson // *Progr. Biochem. Pharmacol.* 1967. Vol. 3. P. 59–70.

207. *Schroeder, H. A.* The human body burden of lead / H. A. Schroeder, I. H. Tipton // *Arch. Environ. Health.* 1968. Vol. 17. P. 965–978.

208. *Shelton, R.* The induction of stress-related proteins by lead / R. Shelton, J. M. Todd, M. Egle // *J. Biol. Chem.* 1986. Vol. 261, № 4. P. 1935–1940.

209. *Reduction* in exposure to lead from drinking water and its effects on blood lead concentration / I. C. Sherlock [et al.] // *Hum. Toxicol.* 1984. Vol. 3, № 5. P. 383–392.
210. *Silbergeld, E. K.* Lead-induced behavioral dysfunctions: an animal model of hyperactivity / E. K. Silbergeld, A. M. Goldberg // *Exp. Neurol.* 1974. Vol. 42. P. 146–157.
211. *Silbergeld, E. K.* Evidence for a functional effect of lead on neuromuscular function / E. K. Silbergeld, J. T. Fales, A. M. Goldberg // *Nature (Lond.)*. 1974. Vol. 247. P. 49–50.
212. *Simms, D. L.* Safety margins for lead in the general population / D. L. Simms, M. J. Quinn, J. F. A. Thomas // *Environ. Monit. and assessment*. 1984. Vol. 8, № 2. P. 113–125.
213. *Singer, R.* Messenger RNA in HeLa cells kinetics of formation and decay / R. Singer, S. Penman // *J. Mol. Biol.* 1973. Vol. 78. P. 321.
214. *Singer, R.* Stability of HeLa cells mRNA in actinomycin / R. Singer, S. Penman. // *Nature*. 1972. Vol. 240, № 22. P. 4664–4668.
215. *Sokol, R. Z.* Reversibility of the toxic effect of lead on the male reproductive axis / R. Z. Sokol // *Reprod. Toxicol.* 1989. Vol. 3, № 3. P. 175–180.
216. *Staples, E. L. J.* Experimental poisoning in dogs / E. L. J. Staples // *N. Z. Vet. J.* 1955. № 3. P. 39–46.
217. *Stern, R.* Double-stranded RNA synthesized in animal cells in the presence of actinomycin D / R. Stern, R. Friedman // *Nature*. 1970. Vol. 226, № 5246. P. 612–616.
218. *Sugawara, E.* Lipid peroxidation and concentration of glutathione in erythrocytes from workers exposed to lead / E. Sugawara, K. Nakamura, T. Miyake // *Brit. J. Ind. Med.* 1991. Vol. 48, № 4. P. 239–242.
219. *Suzuki, K.* 12-0-tetradecanoylphorbol 13-acetate potential the action of cAMP in inducing DNA cleavage in thymocytes / K. Suzuki, H. Kizaki, T. Tadakuma // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1990. Vol. 171, № 2. P. 827–831.
220. *Swiatek, J.* Some aspects of lead(II) DNA interactions / J. Swiatek, B. Gulanowski // *Acta Biochimica Polonica*. 1990. Vol. 37, № 1. P. 7–20.
221. *Swiatek, J.* Voltametric and spectroscopic studies on interactions of lead (II) ions calfthymus DNA: in Proceedings of II Symposium on Inorganic Biochem and Molecular Biophysics / J. Swiatek, E. Koglin, J. M. Sequaris. 1989. P. 335–341.
222. *Swiatek, J.* Electrochemical studies on the DNA interaction with Zn(II) and Cd(II) ions / J. Swiatek, T. Pawlowski, H. Kozlowski // *Stud. Biolphys.* 1987. Vol. 122. P. 195–200.
223. *Swiatek, J.* Differential pulse polarographic approach to Zn(II) and Cd(II)-DNA system / J. Swiatek, T. Pawlowski, K. Gasiorowski // *Inorg. Chim. Acta*. 1987. Vol. 138. P. 79–84.
224. *Tepper, L. B.* A survey of air and population lead levels in selected American communities / L. B. Tepper, L. S. Levin // Final report to the US EPA.
225. *Thompson, P. A.* Regulation of human B cell proliferation by prostaglandin E2 / P. A. Thompson, D. F. Jelinek, P. E. Lipsky // *J. Immunol.* 1984. Vol. 133, № 5. P. 2446–2453.
226. *Tobias, L. D.* Chromatography of prostaglandins utilizing silic acid / L. D. Tobias, J. K. Paulsrud // *Prostaglandins*. 1975. Vol. 9. P. 57–60.
227. *Tola, S.* Occupational lead exposure in Finland. III: lead scrap smelteries and metal shops / S. Tola // *Work Environ. Health*. 1974. № 11. P. 114–118.

228. *Torelli, U.* Characteristics of heterogenous nuclear RNA in normal small lymphocytes and acute leukemia blast cells / U. Torelli // *Acta Haematol.* 1975. Vol. 54, № 4. P. 234–241.

229. *Van Esch, G. J.* The induction of renal tumours by feeding basic lead acetate to mice and hamsters / G. J. Van Esch, R. Kroes // *Brit. J. Cancer.* 1969. Vol. 16. P. 289–297.

230. *Vatsuyanagi, J.* Enhancement of Zymosan-induced respiratory burst of rat neutrophils by lead in vitro / J. Vatsuyanagi, S. Muraoka, R. Tsutsui // *Chem. and Pharm. Bull.* 1989. Vol. 37, № 5. P. 1347–1350.

231. *Veigl, M. Z.* Calcium and calmodulin in cell growth and transformation / M. Z. Veigl, T. C. Vanaman, W. D. Sedwick // *Biochim. Biophys. Acta.* 1984. Vol. 738, № 1/2. P. 21–48.

232. *Venugopal, B.* Metal toxicity in mammals / B. Venugopal, T. D. Luckey // New York Plenum press. 1978. Vol. 2. 409 p.

233. *Warner, J. R.* A multiple ribosomal structure in protein synthesis / J. R. Warner, P. M. Knopf, A. Rich // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 1963. Vol. 49, № 1. P. 122–129.

234. *Waxman, H. S.* Control of reticulocyte polyribosome content and hemoglobin synthesis by heme / H. S. Waxman, M. Rabinovitz // *Biochim. Biophys. Acta.* 1966. Vol. 129, № 2. P. 369–379.

235. *Weinberg, R. A.* Processing of 45S nucleolar RNA / R. A. Weinberg, S. Penman // *J. Mol. Biol.* 1970. Vol. 47. P. 169.

236. *Wendell, P. L.* Distribution of glutathione reductase and detection of glutathione-cystine transhydrogenase in rat tissues / P. L. Wendell // *Biochim. Biophys. Acta.* 1968. Vol. 159, № 1. P. 179–181.

237. *Whitfield, C. L.* Lead encephalopathy in adults / C. L. Whitfield, L. T. Chien, J. D. Whitehead // *Am. J. Med.* 1972. Vol. 52. P. 289–298.

238. *Widom, J.* Inhibition of cation-induced DNA condensation by intercalating dyes / J. Widom, R. L. Baldwin // *Biopolymers.* 1983. Vol. 22. P. 1621–1632.

239. *Wiley, J.* Nucleic Acid-Metal Ion Interactions (T. Spiro ed.) / J. Wiley, N. Y. Sons // *Metal Ion in Biology.* 1980. Chapt. 2, 4, 5.

240. *Wilson, R. W.* Counterion-induced condensation of deoxyribonucleic acid study / R. W. Wilson, V. A. Bloomfield // *Biochemistry.* 1979. Vol. 18. P. 2192–2196.

241. *Zwadlo-Klarvasser, G.* Effect of heavy metal ions on the phagocytosis of human blood monocytes / G. Zwadlo-Klarvasser, C. Gottsch // *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1991. Vol. 343, Suppl. P. 26.

242. *Xiao, Gonghua.* Ингибирование включения аминокислот в микросомах под действием кадмия, ртути и свинца / Gonghua Xiao, Lindao Wang, Yugu Liu // *Хуань-цзин Кэсюэ Сюэбао, Acta Sci. Circum-stantial.* 1987. Vol. 7, № 3. P. 333–338.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	3
Глава 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ОБ ИСТОЧНИКАХ, ПУТЯХ ПОСТУПЛЕНИЯ В ОРГАНИЗМ И МЕХАНИЗМАХ ДЕЙСТВИЯ СОЕДИНЕНИЙ СВИНЦА (Т.В. Латушко)	7
1.1. Основные источники и пути поступления в организм соединений свинца	7
1.2. Распределение в организме и механизмы действия соединений свинца	12
Глава 2. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О МЕТОДИКАХ ПРОВОДИВШИХСЯ ИССЛЕДОВАНИЙ (Т.В. Латушко)	21
2.1. Лабораторные животные, приготовление клеточной суспензии и ее характеристика	21
2.2. Радиоизотопные и радиоиммунные методы	22
2.3. Исследование интенсивности макромолекулярных биосинтетических процессов в спленоцитах крыс при свинцовом отравлении	24
2.4. Химико-аналитические методы	24
2.5. Спектральные методы исследования и математическая обработка данных	25
2.6. Используемые реактивы и препараты	25
Глава 3. СОСТОЯНИЕ МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В Pb ²⁺ -ОБРАБОТАННЫХ СПЛЕНОЦИТАХ И ПРИ СВИНЦОВОЙ ИНТОКСИКАЦИИ (Е.В. Барковский)	26
3.1. Влияние ацетата свинца на синтез ДНК в спленоцитах крыс	27
3.2. Влияние ацетата свинца на синтез РНК в спленоцитах крыс	33
3.3. Влияние ацетата свинца на синтез белка в спленоцитах крыс	43
3.4. Влияние свинцовой интоксикации на интенсивность макромолекулярных биосинтетических процессов в спленоцитах крыс	46
Глава 4. РОЛЬ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ, КАЛЬЦИЙ-КАЛЬМОДУЛИНОВОЙ СИСТЕМЫ, ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ И ПРОСТАГЛАНДИНОВ В МЕХАНИЗМАХ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ АЦЕТАТА СВИНЦА (Т.В. Латушко)	54

4.1. Влияние ацетата свинца на перекисное окисление липидов в спленоцитах крыс	55
4.2. Роль внеклеточных ионов кальция в цитотоксическом действии ацетата свинца	58
4.3. Влияние хлорпромазина — антагониста кальмодулина на включение радиоактивных предшественников в ДНК, РНК и белок Pb ²⁺ -обработанных спленоцитов	62
4.4. Влияние ацетата свинца на внутриклеточный уровень циклических нуклеотидов и простагландинов в спленоцитах крыс	68
4.5. Влияние 2-меркаптоэтанола на интенсивность включения радиоактивных предшественников в ДНК и РНК Pb ²⁺ -обработанных спленоцитов	70
ЗАКЛЮЧЕНИЕ (Е.В. Барковский).....	74
ЛИТЕРАТУРА.....	83

Научное издание

Барковский Евгений Викторович
Латушко Татьяна Викторовна

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ СВИНЦА

Монография

Ответственный за выпуск Е.В. Барковский
Редактор Н.А. Лебедко
Компьютерный набор О.И. Смирновой
Компьютерная верстка Н.М. Федорцовой
Корректор Ю.В. Киселёва

Подписано в печать 28.11.05. Формат 60×84/16. Бумага писчая «КюмЛюкс».
Печать офсетная. Гарнитура «Times».
Усл. печ. л. 5,81. Уч.-изд. л. 6,46. Тираж 100 экз. Заказ 245.
Издатель и полиграфическое исполнение –
Белорусский государственный медицинский университет.
ЛИ № 02330/0133420 от 14.10.2004; ЛП № 02330/0131503 от 27.08.2004.
220030, г. Минск, Ленинградская, 6.