

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Курамшина Гульназ Ришатовна

СИСТЕМА ГЛУТАТИОНА В КОСТНОЙ ТКАНИ ПРИ ДЕЙСТВИИ
ЭЛЕМЕНТОВ МЕДНО-ЦИНКОВОЙ КОЛЧЕДАННОЙ РУДЫ

3.3.3. Патологическая физиология

Диссертация
на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук, доцент
Фаршатова Е.Р.

доктор медицинских наук, профессор,
Заслуженный деятель науки РФ и РБ
Камилов Ф.Х.

Уфа – 2021

Оглавление

Введение.....	4
Глава 1 Обзор литературы.....	13
1.1 Влияние тяжелых металлов на метаболизм костной ткани.....	13
1.2 Обмен глутатиона	21
1.3 Биологические функции глутатиона.....	23
Глава 2 Материалы и методы исследования	34
2.1 Объекты и дизайн исследования	35
2.2 Методы исследования.....	37
2.2.1 Изучение обмена костной ткани.....	37
2.2.2 Изучение содержания продуктов перекисного окисления липидов	38
2.2.3 Исследование системы глутатиона, других показателей ферментативного и неферментного звеньев антиоксидантной защиты	40
2.2.4 Гистологические методы исследования	48
2.3 Статистическая обработка результатов	49
Глава 3 Результаты собственных исследований	50
3.1 Влияние элементов медно-цинковой колчеданной руды на некоторые показатели обмена костной ткани в плазме крови экспериментальных животных...50	
3.2 Интенсивность перекисного окисления липидов в костной ткани при действии элементов, содержащихся в медно-цинковой колчеданной руде	53
3.3 Система глутатиона и другие компоненты антиоксидантной защиты в костной ткани экспериментальных животных при действии элементов медно-цинковой колчеданной руды.....	55
3.4 Глутатионовая система печени при интоксикации элементами медно-цинковой колчеданной руды.....	59

3.5 Влияние элементов медно-цинковой колчеданной руды на гистологическую структуру костной ткани крыс.....	64
3.6 Эффективность действия антиоксидантного препарата на систему глутатиона в костной ткани и печени при длительной интоксикации элементами медно-цинковой колчеданной руды.....	82
Глава 4 Обсуждение результатов исследования	91
Выводы	108
Список сокращений и условных обозначений	110
Список литературы	112

Введение

Актуальность темы исследования

Воздействие тяжелых металлов на организм человека продолжает оставаться одной из актуальных направлений научных исследований [98]. Особую опасность представляют соли свинца, ртути, кадмия, меди, кобальта, железа. Потенциальным источником загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами и другими токсичными элементами являются месторождения и добыча руд цветных металлов. На территории Республики Башкортостан расположено пять активно разрабатываемых месторождений медно-цинковых колчеданных руд, содержащих в своем составе более 80 минералов, включая пирит, халькопирит, серицит, сфалерит и хлорит и другие, включающих медь, цинк, серу, хром, марганец, кадмий, свинец, серебро, мышьяк, железо, ртуть, никель, теллур, сурьму, таллий и другие элементы. Работники предприятий горнорудной промышленности, занятые добычей и обогащением цветных металлов, подвергаются воздействию высокодисперсной рудничной пыли, выделение которой сопровождается основными технологическими процессами. Тяжелые металлы и их соединения проникают в организм через воздух, воду, пищу, оседают на коже, ногтях и волосах, накапливаются и оказывают токсическое воздействие на органы и ткани [10, 59, 81, 175]. В ротовой жидкости, твердых зубных отложениях, крови и волосах у работников горно-обогатительных производств по добыче и переработке медно-цинковых руд установлено значительное превышение содержания Cu, Zn, Fe, Cr, Mn, Cd, Pb, Ag, As и других элементов, содержащихся в руде [36, 59, 75]. Анализ общей и профессиональной заболеваемости на горно-обогатительных комбинатах показывает, что болезни костно-мышечной системы и соединительной ткани среди причин с временной утратой трудоспособности занимают высокое ранговое место [36, 59, 79]. Изучение патогенеза металлиндуцированных остеопений и поиск возможных путей их коррекции остается актуальной задачей для медицинской науки.

Действие тяжелых металлов и других токсичных элементов при их накоплении в тканях обусловлено нарушением металлолигандного гомеостаза, образованием комплексов с функциональными группами биомолекул, изменяя их конформацию и биологическую активность. Особое место в этих механизмах занимает их взаимодействие с соединениями, имеющими тио-, алкилтио-, тиоэфирные и дисульфидные группы. Избыточное поступление, накопление или внутриклеточное высвобождение металлов с переменной валентностью, особенно тяжёлых, провоцирует в тканях усиление генерации активных форм кислорода и активацию процессов свободнорадикального окисления с развитием окислительного стресса [9, 71, 154, 155, 175, 196].

Ведущую роль в процессах детоксикации металлов, ксенобиотиков и эндогенных токсичных продуктов, в поддержании окислительно-восстановительного пула, являясь ключевым компонентом, играет система глутатиона [11, 66, 92, 121, 144, 147].

Восстановленный глутатион и ферменты глутатионовой системы выполняют важнейшие функции в интегративной защитной системе организма, способствуя клеточной адаптации к стрессирующим воздействиям, оказывают влияние на течение клеточного цикла, процессы пролиферации и дифференцировки, апоптоза и ферроптоза клеток [28, 35, 87, 91, 105, 113, 115, 175].

Степень разработанности темы

Данная работа является продолжением изучения патогенетических механизмов повреждающего действия на костную ткань комплекса элементов, содержащихся в медно-цинковой колчеданной руде. Ранее проведенные исследования показали, что у горняков, добывающих медно-цинковую колчеданную руду подземным способом, остеопенический синдром выявляется в 2-4 раза чаще, чем у рабочих наземных служб того же предприятия и жителей близлежащих территорий, а формирование остеопороза у горняков наблюдается в молодом возрасте и коррелирует со стажем работы [22, 36, 50, 76]. Моделирование хронического поступления элементов руды в организм экспериментальных животных показал, что

большая группа элементов (Zn, Cu, Fe, Sr, Mn, Cr, Cd, Hg, Pb) накапливается в костях, оказывая негативное влияние на их метаболизм [20, 22, 49, 50, 76]. Согласно результатам этих исследований остеотоксическое действие элементов руды цветных металлов характеризуется нарушениями координации остеокласто- и остеобластогенеза, изменением выработки системных и локальных регуляторных факторов метаболизма костной ткани, усилением интенсивности свободно-радикального окисления. Особое значение в механизмах токсического действия тяжёлых металлов при длительном поступлении в организм даже в низких концентрациях придаётся нарушениям антиоксидантной защиты [5, 9].

Изучение роли системы глутатиона в костной ткани в патохимических механизмах развития остеопении и остеопороза при действии элементов полиметаллических руд и возможности коррекции изменений введением антиоксидантов представляет интерес не только в связи с ролью глутатиона, как кофактора в детоксифицирующих реакциях, катализируемых глутатионзависимыми ферментами. Интересно также значение этой системы в регуляции окислительно-восстановительного потенциала клеток, активности тиолзависимых ферментов, рецепторов и транскрипционных факторов, её влияния на процессы ремоделирования костной ткани.

Цель исследования. Выявление патогенетической значимости нарушений системы глутатиона в костной ткани в механизмах развития остеопении при воздействии комплекса элементов, содержащихся в медно-цинковой колчеданной руде, и оценка эффективности действия антиоксидантного витаминного препарата.

Задачи исследования

1. Изучить интенсивность процессов ремоделирования и перекисного окисления липидов в костной ткани, показатели катаболизма коллагена и минерального обмена при хронической интоксикации элементами, содержащимися в медно-цинковой колчеданной руде.

2. Охарактеризовать влияние комплекса элементов медно-цинковой колчеданной руды на систему глутатиона и функционально связанных с ней компонентов антиоксидантной защиты в костной ткани.

3. Исследовать действие компонентов руды на систему глутатиона в печени экспериментальных животных.

4. Изучить изменения микроархитектоники и ультраструктуры ткани трубчатой кости при длительном поступлении в организм экспериментальных животных элементов полиметаллической руды.

5. Оценить эффективность применения антиоксидантного препарата на систему глутатиона костной ткани и печени крыс при хронической интоксикации элементами, содержащимися в медно-цинковой колчеданной руде.

Методология и методы исследования

Работа является экспериментальным исследованием, выполненным с использованием научной методологии, с применением формально-логических, общенаучных и специфических методов. Она проведена по принципу случай-контроль с участием подопытных животных (белые беспородные половозрелые крысы-самцы, содержащиеся в идентичных условиях вивария) путем моделирования ситуации с хроническим поступлением в организм элементов медно-цинковой колчеданной руды в низких концентрациях. Для достижения цели и решения задач исследования использовались преимущественно биохимические методы: спектрофотометрия, иммуноферментный анализ, колорометрия; как вспомогательные методы применялись гистохимические и электронно-микроскопические; результаты исследования подвергнуты адекватными методами статистического анализа. Все эксперименты проведены с учетом требований международных и российских законодательных актов о юридических и этических принципах исследований с использованием подопытных животных, одобрены этическим комитетом ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России (от 22.12.2016 г.).

Научная новизна

В экспериментах с моделированием хронического поступления элементов медно-цинковой колчеданной руды подтверждено, что негативное действие руды на метаболизм костной ткани проявляется повышением катаболизма коллагена, дискоординацией ремоделирования с превалированием процессов резорбции, нарушением минерального обмена, интенсификацией перекисного окисления липидов.

Впервые изучена патогенетическая роль системы глутатиона в развитии металлиндуцированной остеопении при хронической интоксикации низкими дозами медно-цинковой колчеданной руды. Выявлено значительное падение уровня восстановленного глутатиона и свободных сульфгидрильных групп белков, ингибирование активности глутатионзависимых ферментов – глутатионпероксидазы, глутатионтрансферазы и γ -глутамилтранспептидазы, основных ферментов системы его регенерации - глутатионредуктазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. Установлено снижение в костной ткани функционально связанных с системой глутатиона содержания α -токоферола и аскорбиновой кислоты, активности супероксиддисмутазы и каталазы. Показано, что изменения метаболизма глутатиона в костной ткани при хроническом действии природного комплекса солей тяжёлых металлов медно-цинковой руды протекают на фоне нарушений системы глутатиона в печени.

Получены новые данные об изменении ультраструктуры эпифиза и диафиза трубчатых костей экспериментальных животных при интоксикации комплексом элементов руды цветных металлов. Показано что, наблюдается деструкция всех клеточных элементов остеоцитов и их исчезновение в лакунах кости, дезорганизация и деструкция микроархитектоники с рассасыванием и истончением костных пластинок, усиление резорбции и снижение костеобразования, уменьшение суммарной площади костных трабекул, их поперечного разреза, а также количества остеонов и толщины суставного хряща эпифизов.

Выявлен положительный эффект применения антиоксидантного витаминного препарата (комплекса витаминов с микроэлементом) на фоне интоксикации

экспериментальных животных элементами, содержащимися в медно-цинковой руды. Показано, что введение витаминного препарата, содержащего α -токоферол, β -каротин, аскорбат и селен, улучшает состояние системы глутатиона в костной ткани и печени, повышая уровни восстановленного глутатиона, активируя ферменты глутатионового цикла и антиоксидантной защиты, подавляет в костной ткани интенсификацию резорбционных процессов.

Теоретическая и практическая значимость работы

Уточнены патофизиологические механизмы токсического действия на костную ткань комплекса элементов, содержащихся в медно-цинковых колчеданных рудах. Выявлена роль нарушений системы глутатиона в патохимических изменениях метаболизма костной ткани в развитии остеопенического синдрома при действии компонентов руды цветных металлов. Экспериментально установлена эффективность использования антиоксидантного препарата (комплекса витаминов с микроэлементом) для профилактики развития остеопенического состояния. Показано корригирующее влияние препарата на систему глутатиона, играющую ведущую роль в процессах детоксикации токсичных элементов и антиоксидантной защиты в условиях длительного действия малых доз компонентов, содержащихся в медно-цинковой колчеданной руде, что может быть использовано при разработке профилактических и лечебных мероприятий у рабочих горнодобывающих предприятий, работающих в условиях контакта с аэрозолями руд цветных металлов.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Длительное поступление комплекса элементов руды цветных металлов нарушает систему глутатиона в костной ткани и печени, ингибирует активность основных антиоксидантных ферментов и снижает содержание α -токоферола и аскорбиновой кислоты, вызывая активацию перекисного окисления липидов.

2. Изменения метаболизма глутатиона в костной ткани при хронической интоксикации медно-цинковой рудой протекают на фоне нарушений системы глутатиона в печени.

3. Применение антиоксидантного препарата (комплекса витаминов с микроэлементом) на фоне хронического поступления в организм малых доз элементов медно-цинковой колчеданной руды оказывает корригирующее действие на систему глутатиона и метаболизм костной ткани.

Степень достоверности, апробация результатов исследования, личное участие автора

Степень достоверности полученных результатов и обоснованность выводов базируется на адекватности экспериментальной модели, достаточном объёме исследований, использовании сертифицированного оборудования и реактивов, современных методов исследования; актами внедрения результатов работы и проверке первичной документации; адекватной статистической обработке результатов.

Содержащиеся в работе результаты получены лично автором или при его непосредственном участии на всех этапах выполняемой работы. Определение темы диссертационной работы, цели и задач исследования проводились автором совместно с научными руководителями д.м.н., доцентом Фаршатовой Е.Р. и д.м.н., профессором Камиловым Ф.Х. Автором самостоятельно проведены изучение отечественной и зарубежной литературы, постановка экспериментальных исследований, методов, статистическая обработка, оценка и анализ полученных результатов, написание статей, оформление диссертационной работы.

Основные результаты диссертации изложены и обсуждены на 82-й и 83-й Всероссийских итоговых молодежных научных конференциях с международным участием «Вопросы теоретической и практической медицины» (Уфа, 2017, 2018); на международном научном конгрессе, посвященном 100-летию Пермского государственного медицинского университета им. академика Е.А. Вагнера «Актуальные вопросы медицины 21 века» (Пермь, 2016); VIII и XI Российских научно-

практических конференциях «Здоровье человека в XXI веке» (Казань, 2016, 2019); Российском конгрессе по остеопорозу, остеоартрозу и другим метаболическим заболеваниям скелета (Казань, 2016); Всероссийской образовательно-научно-практической конференции студентов и молодых специалистов с международным участием «Биохимические научные чтения памяти академика РАН Е.А. Строева» (Рязань, 2017); межрегиональной научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы медицинской биохимии и лабораторной диагностики» (Ижевск, 2017); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Медицинская биохимия – от фундаментальных исследований к клинической практике. Традиции и перспективы», посвященной 90-летию профессоров А.Ш. Бышевского и Р.И. Лифшица (Тюмень, 2019); совместном заседании проблемной комиссии «Морфология и общая патология», кафедры биологической химии и кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, 29 июня 2020 г.

Внедрение результатов исследования в практику

Основные результаты диссертационного исследования используются в учебном процессе на кафедрах биологической химии (акт от 15.06.2020г.), патологической физиологии (акт от 15.04.2021г.), гигиены с курсом медико-профилактического дела ИДПО (акт от 15.04.2021г.) ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, на кафедрах биологической химии (акт от 02.06.2021г.), патологической физиологии (акт от 02.06.2021г.) ФГБОУ ВО ИГМА Минздрава России, на кафедре патологической физиологии ФГБОУ ВО УрГМУ Минздрава России.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 16 работ, в том числе 6 – в изданиях, включенных в «Перечень рецензируемых научных изданий или входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание учёных степеней доктора и кандидата наук», из них 1 статья в журнале,

входящем в международные базы данных Scopus и Web of Science. 7 работ опубликованы в материалах конференции, имеется 3 публикации в электронных научных изданиях.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 135 страницах машинописного текста, и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, главы собственных исследований, обсуждения результатов, выводов.

Библиографический указатель включает 204 источника, в т.ч. 81 на русском языке, 123 – на иностранном. Работа содержит 19 таблиц и 37 рисунков.

Глава 1 Обзор литературы

1.1 Влияние тяжелых металлов на метаболизм костной ткани

Костная ткань характеризуется интенсивным метаболизмом и протекающей на протяжении всей жизни перестройкой – ремоделированием. Объем процесса ремоделирования, происходящего в разных участках скелета с участием остеокластов (ОК) и остеобластов (ОБ), охватывает примерно 10% костной ткани в год. Длительность цикла, включающего фазы инициации ремоделирования, резорбции, реверсии костеобразования, колеблется у человека от 6 до 9 месяцев. Функциональное сопряжение ОК и ОБ осуществляется в основных метаболических единицах (BMU). В костях взрослого человека одновременно действует около 2 млн BMU. Каждая BMU изолирована кластом остеобластных клеток и действует в замкнутом пространстве. ОК и ОБ являются клетками с аэробным характером обмена, что обеспечивается значительной площадью контактов микроциркуляторного русла с межклеточной жидкостью в костном веществе, остециты приспособлены к более низкому парциальному давлению кислорода [48]. Функции ОК связаны с резорбцией костной ткани: продукцией энзимов, катаболизирующих органический матрикс, созданием оптимальной среды для растворения минерального вещества кости и действия ферментов. Функции ОБ направлены на синтез коллагеновых белков и созреванию их волокон; продукцию неколлагеновых белков и ферментов внеклеточного матрикса, участвующих в его формировании; выделение кальция, фосфатов и других компонентов, необходимых для минерализации остеоида, экспрессии межклеточных регуляторных факторов. Остециты обеспечивают организацию локальных деформации и развитие адаптивного ремоделирования, вызываемых нагрузкой на костную ткань, периостиоцитарный остеолиз, остеоцитарную остеоплазию, экспрессию ряда сигнальных молекул и структурных компонентов костного матрикса [48].

Кость является основным резервуаром большинства катионов и её метаболическая функция связана с поддержанием постоянной концентрации кальция и фосфата в крови, а также других макро- и микроэлементов. Основная масса Ca (99%), содержащегося в организме, фосфора (80%), Mg (60%) находится в костной ткани [46]. Анализ костной ткани методами атомно-абсорбционной спектроскопии, рентгенофазовой порошковой дифракции, инфракрасной спектрометрии, ядерно-магнитного резонанса и др. показывает, что изменение химического состава кости, включающего помимо основных органических элементов (C, H, N) около 50 гетероатомов, градиента концентрации гидроксиапатита и минеральных включений в ячеистой структуре кости, отражается на физических свойствах и указывает на взаимосвязь с имеющимися в ней морфологическими и метаболическими преобразованиями. В образцах интактной костной ткани неорганическая часть содержит в основном гидроксиапатит и карбонат кальция, а также представлен гидроксиапатитом смешанного переменного состава с частичным замещением: $\text{Ca}_{9-x}\text{Me}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Степень замещения составляет $x=0,1-0,2\%$, а замещающими элементами являются Me – металлы (Fe, Mg, Zn, Sr и др.) [31, 162].

Тяжелые металлы – это группа элементов со свойствами металлов, имеющие значительный атомный вес, выше 50. Ряд из них жизненно необходим для организма, более 10 элементов среди них являются приоритетными загрязнителями, в частности Mn, Zn, Cu, Sn, Pb, Mo, Co, Hg, Cd, Ni, Cr [43, 46, 71, 72, 175]. Поступление тяжелых металлов и токсичных элементов в окружающую среду имеют как природное, так и техногенное происхождение. Техногенная доля Ni в окружающей среде промышленных центров составляет 30%, Hg и Cd – 50%, Cu и Zn – 75%, Pb – от 50% до 80%. Основными источниками поступления тяжелых металлов в атмосферу являются предприятия горно-рудной промышленности, черной и цветной металлургии, автомобильный транспорт [59].

Месторождения и добыча руд цветных металлов являются потенциальными источниками загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами и другими токсичными элементами. Изучение здоровья населения, проживающего в регионах рудных месторождений, характеристика профессиональной и общей заболе-

ваемости на предприятиях добычи и обогащения цветных металлов, свидетельствует об их негативном влиянии [10, 54, 59, 75]. При этом обращает внимание, что у горнорабочих болезни костно-мышечной системы и соединительной ткани занимают высокое ранговое место среди причин временной потери трудоспособности [59, 64]. Определение минеральной плотности костной ткани у горняков, добывающих медно-цинковые колчеданные руды подземным способом, выявило 2-4 раза большую частоту остеопении по сравнению с рабочими наземных служб того же предприятия [36]. Обследование более 500 рабочих, занятых добычей руды цветных металлов, с использованием ультразвуковой остеоденситометрии по Т-критерию костей периферического скелета также позволило установить высокую частоту выявляемости снижения минеральной плотности костной ткани [50]. Профессиональный контакт с тяжёлыми металлами и другими токсичными элементами у рабочих предприятий по добыче руды приводит к поступлению и накоплению их в организме. Ведущим фактором вредного влияния производственной среды у горняков является рудничная пыль мелкодисперсного характера [59]. Так, в крови у рабочих горно-обогатительного комбината, добывающих и обогащающих медно-цинковую колчеданную руду, увеличено содержание Zn, Co, Cd, в волосах – многократно повышено концентрации Cd, Cr, Cu, Zn, двукратно – Mg, Pb, As, Hg, снижено – Se и I [8, 19, 81], а также наблюдается повышение содержания Cu, Zn, As, Pb, Ca и Fe в ротовой полости и зубных отложениях [54, 75].

Накапливающиеся в организме металлы вызывают дисэлементоз, способствуют формированию различных патологических состояний, в том числе и в костной ткани [9, 10, 53, 81, 152, 179, 185].

О накоплении элементов, содержащихся в медно-цинковой колчеданной руде, в костной ткани свидетельствуют экспериментальные исследования. Так, изучение содержания в бедренной кости половозрелых самцов крыс методами атомно-абсорбционной спектроскопии и вольтамперометрического анализа после ежедневного в течение 3-х месяцев внутрижелудочного дозированного введения суспензии измельченного до мельчайшего порошка медно-цинковой колчеданной руды в 2% растворе крахмала показало увеличение содержания в ней Zn, Cu, Fe,

Mn, Sr, Cd, Hg и Cr, снижение содержания Mg. Уровень Cu при этом в костной ткани увеличился более 45 раз, Pb - около 20 раз, Hb - 5 раз, Zn - 4 раза, Mn и Fe - более 2-х раз [50, 77]. В костной ткани при длительном воздействии компонентов медно-цинковой колчеданной руды обнаруживаются усиление катаболизма коллагена и других органических полимеров внеклеточного матрикса, снижение биосинтеза коллагеновых и неколлагеновых белков, превалирование процессов резорбции кости, активация остеокластогенеза и ингибирование остеобластогенеза [74, 76].

Медно-цинковая колчеданная руда представляет собой природный комплекс солей тяжелых металлов, среди которых имеются свинец, кадмий, ртуть, мышьяк, оказывающих прямое токсическое влияние на органы и системы человека [9, 30, 81, 108, 154, 155, 196].

Особой остеотропностью обладает свинец. 80-90% поступающего в организм Pb накапливается в костной ткани [158]. Pb всасывается в кишечнике и транспортируется с участием транспортёра двухвалентных металлов (DMT1 ZIP8 и ZIP14), снижая всасывание кальция в кишечнике. Свинец вытесняет кальций в костной ткани из гидроксиапатита, снижая прочность кости, нарушая процессы формирования, минерализации и метаболизма [9, 15, 122, 203]. Кроме того, Pb внутриклеточно связывается с белками, богатыми Асп и Глу. Мишенями для Pb являются также цинковые пальцы на ДНК-связующих факторах, факторы транскрипции Sp1 и Egr-1, NOXY/Nrf2/GCLC/GST сигнальные пути, ферменты, рецепторы и каналы, содержащие цинковые пальцы, кальциевые каналы, Ca^{2+} -зависимые калиевые каналы, кальмодулин и протеинкиназа C [146]. Под влиянием свинца происходит нарушение дифференциации и функциональной активности остеобластов [151]. Широкое токсическое действие Pb связано также с тем, что он ингибирует индукцию микросомальных P-450 – монооксигеназ, стимулирует пролиферацию пероксисом, накапливается в митохондриях, вытесняя Fe, Cu, Mn, Se и Zn связывается помимо тиоловых с карбоксильными и фосфатными группировками биомолекул, вызывает развитие оксидативного стресса и снижает резервные возможности системы антиоксидантной защиты [9, 94, 108, 122].

Хроническое воздействие кадмия также нарушает кишечную абсорбцию и обмен кальция, поскольку имеет общий механизм транспорта (DMT1), тормозит секрецию кальцитриола, нарушает функцию почек, стимулирует развитие свободнорадикальных процессов, снижает прочность кости, изменяя её микроархитектонику, задерживает пролиферацию и развитие клеток остеобластического дифферона. Это иммунотоксичный, гонадотоксичный, мутагенный и тератогенный элемент. Cd имеет высокое сродство к радикалам Цис, Глу, Асп и Гис, конкурирует с цинком за важные центры связывания (цинковые пальцы факторов транскрипции) [55, 81, 84, 96, 102, 103, 106, 115, 143, 185, 203].

Высокой токсичностью обладают ртутьсодержащие соединения. Ионы ртути связываются со многими нуклеофильными группами, но особенно активно – с сульфгидрильными (глутатион, цистеин, гомоцистеин, N-ацетилцистеин, металлотинин и другие белки со свободными SH-группами). Hg является ингибитором биосинтеза нуклеиновых кислот и белка, энзимов энергетического обмена, биотрансформации, гидролитических ферментов [46, 55, 143, 175, 190]. Hg вызывает в тканях нарушение оксидантно-антиоксидантного соотношения, экспрессирует провоспалительные цитокины, резко повышает уровень малонового диальдегида, повышает экспрессию с мочой мочевины и креатинина [56, 126].

В сложных взаимоотношениях с кальциевым обменом находится магний. Mg конкурирует за большинство кальцийсвязывающих центров, наряду с Mn^{2+} , Cd^{2+} , Ba^{2+} и Sr^{2+} . Он модулирует внутриклеточный и внеклеточный выброс Ca, и в то же время служит естественным его антагонистом. Магний активирует почти все ферменты, участвующие в метаболизме фосфорилированных соединений, гликолитического окисления, цикла трикарбоновых кислот и др. [46, 55]. Концентрация Mg в клетке постоянна и высока, его гомеостаз строго регулируется и зависит от баланса между кишечным всасыванием и экскрецией почками. Увеличение поступления Mg приводит к стимуляции функций остеокластов и снижению выведения кальция с мочой, недостаточное поступление Mg сопровождается дисбалансом ремоделирования, гипокальциемией, снижением всасывания Ca в кишечнике, что способствует развитию остеопении [46, 124].

Стронций откладывается исключительно в костях, участвует в процессах формирования костей, однако в избытке нарушает остеогенез, встраиваясь в кристаллическую решётку гидроксиапатита, накапливается в неорганической фазе межклеточного вещества кости и нарушает соотношение фосфора с кальцием в костной ткани, вызывая «уровскую болезнь» или «стронциевый рахит». Стронций также легко заменяет кальций и в кальций-связывающих белках [46].

Марганец жизненно важный микроэлемент. Он присутствует во многих тканях, но основная его масса (25-40%) сосредоточена в костях. В кишечнике всасывается в ионной форме с участием трансферринового комплекса, конкурируя с Fe [124]. Транспортёром Mn в клетки является ДМТ-1, но также IP8, ZIP14(переносчики цинка), дикарбоксилатный транспортер трансферриновых рецепторов и кальциевые каналы [164]. Mn участвует в образовании активного центра многих ферментов (аргиназа, алкогольдегидрогеназа, аденилатциклаза, енолаза, карбоксипептидаза, креатинкиназа, пируваткиназа, пируваткарбоксилаза, фосфоенолпируваткарбоксикиназа, фосфоглюкомутаза и др.) [137]. Метаболизм Mn и Mg взаимозаменяемы в связи с аналогичностью их хелатных структур. При высоких концентрациях Mn проявляет токсические свойства: наблюдается дисфункция митохондрий, усиливается генерация активных форм кислорода с развитием оксидативного стресса, нарушаются дофаминэргическая, глутаматэргическая и ГАМК-эргическая системы организма, резко увеличивается его содержание в костях с развитием «марганцевого рахита» [46].

Железо, медь, никель при накоплении в костной ткани вызывают окислительный стресс, который ведет к инактивации ферментов, перекисидации липидов, подавлению генетического аппарата клеток, усилению процессов резорбции. Ионы этих металлов связывают свободные сульфгидрильные группы, подавляют активность глутатионредуктазы, снижая общий антиоксидантный потенциал ткани [85, 124, 125, 130, 153, 168, 182]. Основным компонентом клетки млекопитающих, предназначенным предохранять клеточные системы от разрушительного действия катионов переходных металлов, является металлотенины, богатые цистеином.

Остатки Цис в металлотенинах составляют 20-30% всех аминокислот [110]. Остеопения и/или остеомалация наблюдается у половины больных с болезнью Вильсона. Остеопороз выявляется у более 60% пациентов с гемохроматозом, который протекает с гиперкальциурией, повышенной рентгенопрозрачностью костей, отложениями в костных трабекулах гемосидерина, нередкими переломами позвонков. В то же время дефицит Fe, Cu и Se оказывает негативное действие на состояние костной ткани [46].

Изменения микроэлементного состава и нарушения антиоксидантного статуса выявлены при интоксикации хромом [44, 119].

Цинк не участвует в окислительно-восстановительных реакциях, что делает его стабильным в биологической среде. Он идеальный металлический кофактор для реакций, требующих редокс-стабильный ион. Zn является кофактором более 300 различных ферментов, структурный компонент других белков, включая ДНК-связывающие белки. Zn значимый микроэлемент в костном ремоделировании. Около 30% всего цинка в организме кумулируется в костной ткани [29]. 30-40% клеточного цинка локализовано в ядре, около 50% - в цитозоле и цитозольных органеллах, включая цинкосомы, остальное связано с белками цитоплазматической мембраны. Цинк специфически модифицирует метаболизм цГМФ, активность протеинкиназы C и активируемых митогеном протеинкиназ, фактора транскрипции MTF-1, контролирует транскрипцию генов металлотенина и транспортёра цинка ZIP-1 и, таким образом, выполняет сигнальную функцию на всех уровнях передачи сигнала [55]. Zn является микроэлементом антиоксидантной направленности, поскольку вытесняет связанные с ДНК ионы железа и снижает тем самым катализируемую Fe^{2+} продукцию гидрокси-радикала из пероксида водорода, а окислительное повреждение ДНК определяется, в основном, действием свободного гидрокси-радикала. Избыток цинка может быть токсичен для клеток, хотя механизм его действия остается неясным [124]. Клинических проявлений токсического действия избытка цинка на костную ткань не установлено. Показано, что соединения цинка активно тормозят накопление свинца в костной ткани [14]. В последние годы появились сообщения, что наночастицы оксида цинка усиливают

пероксидацию липидов, повреждают белки и ДНК, ингибируют супероксиддисмутазу, каталазу у мальков карпа [88, 89].

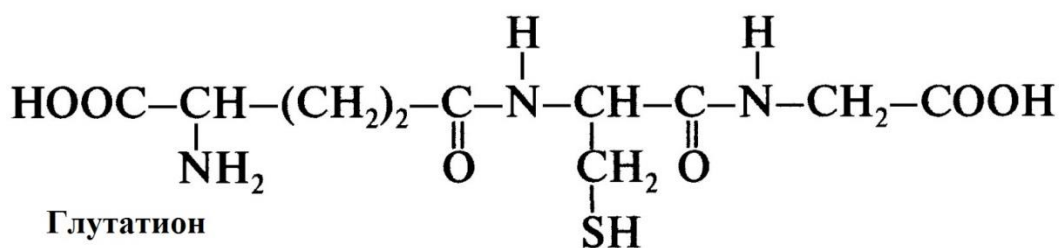
Таким образом, токсическое действие металлов на костную ткань характеризуется разными механизмами действия [71]. Это конкуренция и замещение эссенциальных катионов в металлосодержащих биоконплексах, что приводит к изменениям их биологической активности и определенной дезорганизации метаболических процессов. Важное место в нарушении состояния костной ткани занимает замещение кальция в кристаллической решетке гидроксиапатита другими металлами, близкими к нему по ионному радиусу, что существенно снижает костную прочность. Токсичные металлы нарушают нередко синтез цитохрома P450, ответственного за биотрансформацию токсикантов органической природы, эндогенных биологически активных веществ. В механизмах токсического действия ряда металлов важное значение имеет нарушение функции желез эндокринной секреции, с изменением инкреции гормонов, контролирующих процессы ремоделирования костной ткани (инсулин, эстрогены, тестостерон, паратгормон, глюкокортикоиды, кальцитонин), функционального состояния печени и почек. Токсичные металлы могут нарушать структуру и функции ряда клеточных органелл, митохондрии, эндоплазматического ретикулума, лизосом, ядра. Избыточное накопление или усиление высвобождения эссенциальных металлов с переменной валентностью (Fe, Cu, Mo, Ni, Co, Se) и особенно накопление токсичных микроэлементов (Cd, Hg, Pb) провоцирует в тканях генерацию активных форм кислорода и процессов свободнорадикального окисления. Механизмом токсического действия металлов является также образование комплексов с функциональными группами (фосфатными, карбоксильными) биомолекул, изменяя их конформацию и функциональную активность. Особое место в этих механизмах занимает их взаимодействие с сульфгидрильными группами (-SH), отличающимися высокой аффинностью, или алкилтиогруппами (-SR), тиоэфирными и дисульфидными группами. Функциональная активность большинства ферментов и других белков ингибируется металлами, которые относятся к группе реагентов на SH-группы. Тиольные группы, как сильные нуклеофилы отличаются высокой реакционной способно-

стью, а тиоэфирные и дисульфидные группы вступают в не столь разнообразные реакции.

Действие металлов, вызывающих окислительный стресс, также как и связывающих сульфгидрильные группы (тиоловые яды), несомненно, затрагивает глутатионзависимый баланс тиолы/дисульфиды и всю систему глутатиона.

1.2 Обмен глутатиона

Глутатион – трипептид γ -глутамилцистеинилглицин обнаруживается во всех типах аэробных клеток. Внутриклеточная его молярная концентрация выше большинства органических веществ от 0,5 до 10 мМ, внеклеточное содержание на 3-4 порядка ниже. В физиологическом состоянии около 98% глутатиона находится в восстановленной, тиольной (GSH) форме, хотя представлен в виде дисульфида (GSSG) и смешанных дисульфидов (GS-S-белок и др.) [11, 37].



Биосинтез глутатиона из составляющих его аминокислот происходит во всех клетках млекопитающих в двух АТФ-требующих этапах: первый – это лимитирующий шаг, катализируется глутамат-цистеин-лигазой, который связывает глутамат и цистеин в глутамилцистеин; второй катализируется глутатионсинтетазой с образованием GSH [163]. Синтез GSH контролируется активностью глутамат-цистеин-лигазы, в частности, его регуляторной субъединицей с мол. массой 33 кДа. В нормальных физиологических условиях активность глутамат-цистеин-лигазы, в свою очередь, регулируется неаллостерической обратной связью концентрацией конечного продукта – GSH и уровнем L-цистеина [66, 124]. Еще одной регуляторной переменной для этого фермента является клеточный уровень АТФ

[139]. Цистеин или пара цистеин/цистин является лимитирующей стадией в биосинтезе GSH. В клетках цистеин образуется путем транссульфурации из метионина или поступает извне с помощью Na-зависимого транспортера нейтральных аминокислот. Во внеклеточном пространстве цистеин легко аутоокисляется до цистина, который поглощается клетками и восстанавливается до цистеина внутри клетки. При подавлении транспорта этих аминокислот в клетку наблюдается снижение уровня GSH [163]. В последнее десятилетие показаны механизмы регуляции синтеза GSH не только ограничением скорости реакции, катализируемой глутамат-цистеин-лигазой, но и микроРНК, которые могут действовать на кодирующую последовательность генома субъединиц фермента, либо косвенно, воздействуя на основные регуляторы экспрессии его субъединиц, например, комплекс Nrf2-Keap1, ARE – опосредованную экспрессию генов [165, 194].

Наиболее интенсивно биосинтез глутатиона осуществляется в печени. В физиологических условиях печень обеспечивает около 90% всего циркулирующего глутатиона. Глутатион плазмы крови утилизируется тканями путем транспорта через клеточные мембраны и ресинтеза внутри клетки посредством глутамильного цикла [38].

Гомеостаз глутатиона в клетке регулируется не только его синтезом *de novo*, поскольку существуют и другие релевантные факторы, такие как утилизация, рециркуляция и клеточный экспорт, генерирующие окислительно-восстановительный цикл GSH, включающие важные антиоксидантные, редокс-родственные ферменты [163], известный как цикл глутатиона.

Биодеградация глутатиона в основном осуществляется внеклеточно под влиянием γ -глутамилтранспептидазы и дипептидаз, отщепляющими глутамильный и глицильный остатки. Наличие γ -карбоксильной связи между L-глутамиловым и L-цистеиниловым радикалами в молекуле GSH обеспечивает трипептиду устойчивость к внутриклеточной деградации. Единственный фермент, расщепляющий эту связь, γ -глутамилтранспептидаза связана с наружной поверхностью плазматической мембраны, а С-концевое расположение глицина предотвращает действие внутриклеточной γ -глутамилциклотрансферазы. Образующиеся

при расщеплении глутатиона γ -глутамильные пептиды могут транспортироваться также в клетку, где под влиянием γ -глутамилтрансферы превращаются в соответствующую аминокислоту и 5-оксипролин, который при действии 5-оксопролиназы превращается в глутаминовую кислоту [163].

1.3 Биологические функции глутатиона

Биологические функции глутатиона (Рисунок 1) реализуется через глутатионзависимые ферменты, непосредственно системой GSH-GSSG, а также S-глутатионированием протеинов и конъюгацией различных эндогенных соединений и ксенобиотиков [32, 37, 127, 136]. Остаток цистеина в GSH является ключевым функциональным элементом, содержащим реактивную сульфгидрильную группу, которая ответственна за основные функции этого ведущего небелкового тиола клетки.

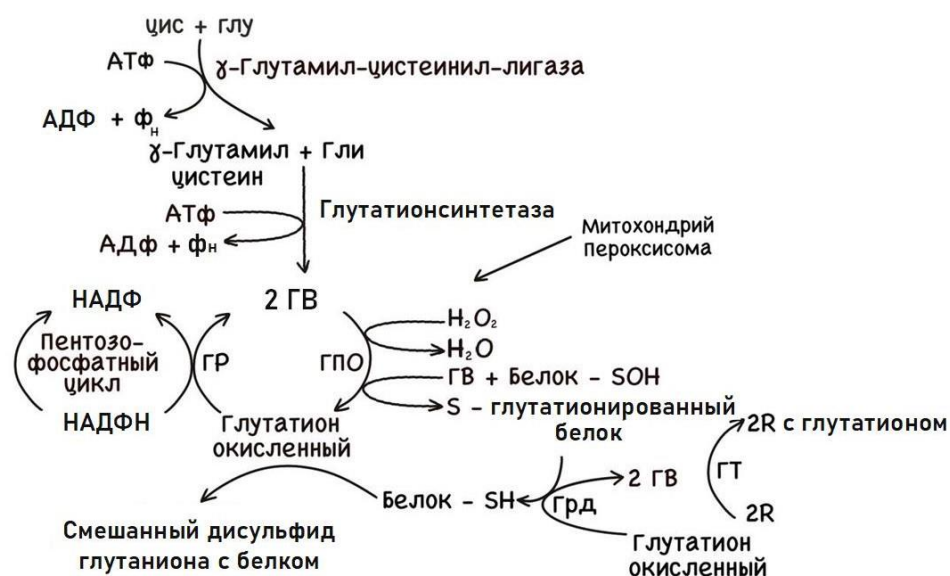


Рисунок 1 – Глутатионовый цикл (ГВ – глутатион восстановленный, ГПО – глутатионпероксидаза, ГР – глутатионредуктаза, Грд – глутаредоксин, ГТ – глутатион-s-трансфераза) по Lu S.C. et al. [165] с изменениями

За последние десятилетия понимание значения GSH значительно продвинулось от своей первой описанной роли в детоксикации тяжелых металлов и ксенобиотиков до ключевой роли в редокс-состоянии клетки, регуляции генов, пролиферации клетки и апоптоза [92], главным образом путем связывания цистеина в белках, в процессе известном как S-глутатионирование протеина.

Наиболее важными функциями глутатиона являются:

- обеспечение сохранности структуры и функциональной активности белков в результате восстановления и изомеризации внутримолекулярных тиол-дисульфидных связей;
- защита биомолекул от оксидативного и нитроксидного повреждения белков, нуклеиновых кислот, липидов и других биомолекул;
- детоксикация поглощенных тяжелых металлов и ксенобиотиков, образовавшихся эндотоксинов и реактивных соединений;
- участие в регуляции биосинтеза белков и их протеолиза, обеспечение трансмембранного переноса аминокислот;
- выполнение функции транспортной и запасной форм цистеина;
- участие в метаболизме лейкотриенов и простагландинов, восстановлении рибонуклеотидов до дезоксирибонуклеотидов;
- модуляция индукции генов, процессов пролиферации и дифференцирования клеток, апоптоза, некроза, аутофагии, ферроптоза [11, 37, 92, 105, 112, 121, 128, 136, 165].

Тиолзависимые ковалентные модификации белков по значимости сопоставимы с фосфорилированием протеинов. Сохранение SH- групп от переокисления или действия тяжелых металлов необходимо для осуществления функции цистеинзависимых белков (ферментов, мембранных переносчиков, рецепторов, передатчиков внутриклеточных регуляторных сигналов, структурных цитоскелета и др.). Одной из основных функций глутатиона заключается в восстановлении тиоловых групп протеинов с участием GSH-зависимой глуторедоксинредуктазой и НАДФ-зависимой тиоредоксинредуктазой [136], и существенное значение в этом

процессе имеет механизм S-глутатионирования белка, позволяющий избежать перекисления белковых цистеинов [104].

Имеются сведения о моделирующем действии восстановленной и окисленной форм глутатиона на каталитические свойства значительной группы ферментов, наличии редокс-контроля функции энзимов [11]. Редокс-статус клетки, отражением которого является соотношение окисленного и восстановленного глутатиона (GSH/GSSG) и цистеин/цистина [61, 181], в физиологических условиях определяет активность редокс-чувствительных энзимов, кальциевый гомеостаз, механизмы внутриклеточной сигнализации (редокс-сигнализация), процессы пролиферации и дифференцировки клеток [112]. Окисленная форма глутатиона, например, может ингибировать аденилатциклазу, рибонуклеотидредуктазу, пируваткиназу, гликогенсинтазу, активировать кислую фосфатазу, глюкозо-6-фосфатазу, γ -аминолевулинатсинтазу, а GSH является кофактором антиоксидантных (глутатионпероксидаза, глутатион-S-трансфераза) и других ферментов (липоксидазы, глиоксидазы) [28].

В аэробных условиях в живых организмах постоянно образуются активные формы кислорода. В физиологических условиях баланс реактивных форм кислорода, их постоянно низкий уровень в клетках обеспечивается детоксикацией системой антиоксидантов [28, 62], включающей ферментативное и неферментативное звенья. Глутатион, являясь ключевым компонентом тиолдисульфидного обмена, занимает центральную позицию различных путей антиоксидантной защиты [4, 24, 38].

К основным неферментативным антиоксидантам относятся глутатион, аскорбиновая кислота (витамин С), α -токоферол (витамин Е), ретинол (витамин А), β -каротины, фолаты (витамин В₉), липоевая кислота, флаваноиды (витамин Р), некоторые аминокислоты (цистеин, таурин), мелатонин, мочевая кислота, альбумин, церулоплазмин, трансферрин и др. Глутатион как прямой антиоксидант инактивирует такие активные формы кислорода, как супероксиданионрадикал, синглетный кислород, гидроксилрадикал, пероксинитрит; стабилизирует мембраны перемещением ацилпероксидов; поддерживает клеточный гомеостаз токоферолов и

аскорбиновой кислоты, участвуя в их восстановлении [28]. Глутатион тесно связан с главным перехватчиком радикалов в липидной фазе биологических мембран – α -токоферолом, а также витамином С, обладающим широким спектром действия и функционирующим как и глутатион в цитозоле клеток [37]. Восстановление дегидроаскорбатного радикала осуществляется за счет глутатионового цикла, а сама аскорбиновая кислота необходима для регенерации окисленного α -токоферола [28]. Восстановление семидегидро – и дегидроаскорбата в клетках осуществляется энзимными системами, включающими микросомальную НАДН-цитохром b_5 -редуктазу, митохондриальную НАДН-семидегидроаскорбатредуктазу, НАДН- и GSH-зависимые цитозольные дегидроаскорбатредуктазы. α -Токоферол непосредственно взаимодействует с такими радикалами, как HO° , O_2° , ROO° , $^1\text{O}_2$, CCl_3° , способен обрывать цепную реакцию липопероксидации, улавливая липидные радикалы (LOO° , LO°). Таким образом, ингибирование радикалов кислорода осуществляется цепью: глутатион-аскорбиновая кислота - α -токоферол, которая транспортирует электроны (в составе атомов водорода) от пиридиновых нуклеотидов (НАДН и НАДФН) к свободным радикалам.

Глутатионовый цикл (Рисунок 1) кроме синтеза и деградации самого трипептида включает восстановление GSSG с участием глутатионредуктазы, использующей восстановленный никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФН). Основным поставщиком НАДФН в цитозоле клеток являются ферменты окислительной фазы гексозомонофосфатного (пентозофосфатного) пути окисления глюкозы – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа и 6-фосфоглюконат-дегидрогеназа, а также ряд других факторов, влияющих на содержание в клетке восстановленных эквивалентов [147].

Глутатион входит в структуру глутатионпероксидазы (GSHPx) и глутатион-S-трансферазы (GST), которые с супероксиддисмутазой и каталазой составляют основу ферментативного звена антиоксидантной защиты. Глутатион работает также как кофактор и субстрат для семейства глутаредоксинов, которые катали-

зируют восстановление дисульфидов (GS-S-белок, S-S связи в белках) в присутствии НАДФН и глутатионредуктазы [37].

Глутатионпероксидаза в клетках млекопитающих также представлена семейством и использует GSH в качестве редуцирующего агента. Около 70% фермента находится в цитозоле, а 20-30% в митохондриях. Глутатионпероксидаза нейтрализует пероксид водорода, пероксиды липидов (гидропероксиды непредельных жирных кислот, холестерин-7 β -гидропероксид), пероксинитрит. Фермент имеет более высокое сродство к H₂O₂, чем каталаза, поэтому защищает от низких концентраций пероксида водорода. Кроме того в митохондриях каталаза отсутствует. Активность GSHPx зависит от уровня образовавшихся пероксидов, однако, если концентрация H₂O₂ резко возрастает, то основную роль в его расщеплении играет каталаза [28].

Выявлено восемь изоферментов глутатионпероксидазы, которые различаются локализацией, структурой субъединиц, первичной структурой, сродством к субстратам, кодируются разными генами [201].

GSHPx1-глутатионпероксидаза первого типа, например, описанная еще в 1957 г. и получившая название «классической», присутствует в цитозоле практически всех клеток млекопитающих, кодируется геном на 3-й хромосоме. По структуре тетрамер, в котором каждая субъединица содержит атом селена в составе характерной аминокислоты – селенистеина. Селен принимает непосредственное участие в каталитическом действии фермента, первоначально окисляясь до селеновой кислоты, которая затем восстанавливается двумя молекулами глутатиона [148].

Экспрессия гена GSHPx1 с увеличением фермента тормозит рост эндотелиальных клеток, повышает устойчивость к действию различных токсинов, защищает клетки от СД95-индуцированного апоптоза, ингибирует 5-липооксигеназу [187].

GSHPx2 – выявляется в эпителиальных клетках кишечника, отвечает за половину общей глутатионпероксидазной активности в желудочно-кишечном тракте, кодируется геном 14-ой хромосомы, состоит из 188 аминокислотных остатков.

GSHPx3 – обнаружен во внеклеточной среде, плазме крови, контролирует концентрацию пероксидов вне клеток, секретируется печенью, легкими, почками. Ген этого изофермента локализован на 5-ой хромосоме. Кроме глутатиона донорами электронов для этой изоформы фермента могут быть использованы глутаредоксин, тиоредоксин, тиоредоксинредуктаза.

GSHPx4 – липофильный фермент, активно взаимодействующий с гидропероксидами фосфатидилхолина, свободного холестерина и его эфиров в биологических мембранах. По структуре является мономером с мол. массой около 22 кДа, содержащим один остаток селеноцистеина. Кодированный его ген локализован на 19-ой хромосоме [161]. Фермент локализован в цитозоле, выявляется во многих тканях.

GSHPx5 – изофермент обнаруживается исключительно в эпидидимисе, не содержит в составе селен, проявляет структурное сходство с глутатионпероксидазами низших эукариотов, может восстанавливать различные тиольные соединения. Селен-независимые GSHPx по механизму действия напоминают глутатион-S-трансферазы, особенно активны при действии на органические пероксиды, чем на H_2O_2 .

GSHPx6 – изофермент, который экспрессируется и функционирует в тканях системы зрения. Ген, контролирующий этот изофермент, локализован на 6-ой хромосоме.

Другие глутатионсвязанные пероксидазы, не содержащие Se, участвуют в процессах биотрансформации ксенобиотиков, связывая их с GSH, что приводит их в более гидрофильное состояние, а также некоторые из них способны восстанавливать органические гидропероксиды, включая гидропероксиды высокомолекулярных органических кислот. Исследования структуры, функциональной активности, регуляции экспрессии глутатионпероксидаз, патологической значимости при различных заболеваниях активно продолжается [3, 18, 57, 149, 150].

В клетках млекопитающих имеется значительная группа ферментов, обладающих глутатионтрансферазной активностью [141, 169]. Глутатион-S-трансфераза включает 22 члена, которых разделяют на несколько классов и три

основных семейства: цитозольное и митохондриальное являются гидрофильными, а третье – микросомальное липофильно и получило еще название MAPEG (мембраносвязанные протеины обмена эйкозаноидов и глутатиона) [188]. GST преимущественно локализованы в цитозоле клеток, выделяют 8 классов цитозольных GST α , μ , π , δ , θ , κ , ω , ξ одна из изоформ фермента обнаружена в хроматине и восстанавливает пероксиды [37, 66]. Изоформы GST кодируются отдельными генами, расположенными на разных хромосомах [90, 138]. Глутатион-S- трансфераза может восстанавливать гидропероксидные группы радикалов жирных кислот фосфолипидов подобно глутатионпероксидазе без предварительного отщепления фосфолипазой, катализировать взаимодействие непосредственно с GSH группу вторичных метаболитов окисленных соединений, включая основной продукт липопероксидации – 4-гидроксинonenаль и эпоксиды [91, 156]. Изучение структурной организации молекул GST, полиморфизма фермента свидетельствуют о его ключевой роли в патогенезе ряда патологических состояний [90, 120, 129, 138, 142, 170, 195, 201].

Основная роль глутатион-S-трансферазы заключается в детоксикации реактивных электрофильных соединений, включая токсины окружающей среды, эндотоксины и продукты окислительного стресса, путем конъюгации с глутатионом, образуя водорастворимые GS-конъюгаты, которые легко транспортируются из клетки под влиянием специфических транспортеров. В экстрацеллюлярной среде глутатион-S-конъюгаты и глутатион-дисульфид подвергаются метаболизму, аналогичному внеклеточному пути деградации глутатиона, а образующиеся при распаде продукты (глицин, глутамат, цистеин) реабсорбируются клеткой и используются для биосинтеза GSH *de novo* и других соединений. Аминогруппы цистеин-S-конъюгатов частично подвергаются ацетилированию под влиянием внутриклеточной N-ацетилтрансферазы с образованием меркаптуратов (N-ацетил-цистеин-S-конъюгатов), которые поступают в кровь, удаляются с желчью или с мочой [141]. GST взаимодействует и с $\text{Cu}^{2+}(\text{II})$, а не только с органическими электрофильными соединениями.

Буферная ёмкость тиоловых соединений представляет собой важный критерий неспецифической резистентности организма. Глубокое истощение GSH способствует развитию апоптоза, некроза и аутофагии, играет решающую роль в недавно описанной запрограммированной гибели клеток – ферроптозе [134, 197]. Изменения клеточного ответа и развития возможно вследствие окисления сульфгидрильных групп регуляторных элементов, фолдинга белков, рецепторов и транскрипционных факторов (Nrf2, NF-kB) [28, 66]. Так, тиолзависимый механизм индукции апоптоза связан с окислением SH-групп тиоредоксина и глутаредоксина, что приводит к диссоциации их комплекса с ASK1 и активации фермента. Инактивация протеинпирофосфатазы GSSG и H₂O₂ происходит путем взаимодействия с SH-группой цистеина цистеинсодержащего домена фермента, и активация энзима возможна только путем образования сульфоновой кислоты, которая может быть восстановлена тиолами. Кроме регуляции метаболических процессов с помощью протеинкиназ и протеинфосфатаз под контролем соотношения GSH/GSSG находятся также механизмы активации факторов транскрипции и их взаимодействие с регуляторными сайтами ДНК. Глутатион и глутатионзависимые ферменты, таким образом, выполняют важную роль в интегративной системе организма, способствуя клеточной адаптации к окислительному стрессу. Этот ответ координирует «антиоксидант», который был найден в промоторах многих генов, в ответ на индукцию окислительным и химическим стрессом [32]. «Редокс-чувствительные» транскрипционные факторы являются ключевыми элементами регуляции программ клеточного развития [87]. Факторы транскрипции могут изменить экспрессию нескольких сотен генов и интенсивность значительной доли ферментативных реакций. При этом указывают на два основных механизма контроля активности факторов транскрипции. Это окисление цистеиновых, метиониновых остатков в молекуле и взаимодействие с металлами переменной валентности, входящих в структуру белковых молекул редокс-сенсоров: NF-kB, AP -1, Nrf-2 [105, 189].

В регуляции систем контроля экспрессии генов и индукции синтеза белка центральное место занимает фактор транскрипции NF-kB. Для взаимодействия

NF- κ B с регуляторным сайтом ДНК необходим консервативный остаток цистеина (Cys 62) в N-концевом домене Rel – протеинов, в том числе p50, p52, p65, p100, p105, c – Rel. Модификации SH-групп изменяют связывание фактора с ДНК. Так, окисление цистеина увеличивают, а S-глутатионилирование и нитрозилирование уменьшают транскрипционную активность [28]. Окисление остатка цистеина является одним из механизмов действия другого важного фактора транскрипции AP-1, поскольку для взаимодействия с ДНК необходимо, чтобы сохранилось восстановленное состояние остатков цистеина (Cys 154) белков c-Fos и (Cys 172) c-Jun. Фактор транскрипции Nrf 2 содержит 7 остатков цистеина, восстановленное состояние которых критически важно для его взаимодействия с участками антиоксидант-респонсивного элемента в составе ДНК. Чувствительные к окислению остатки цистеина имеет регуляторный белок Keap1 (связывает Nrf 2 на мембране ядра или в цитоскелете), вероятно, являющимся сенсором прооксидантного состояния, индуцирующего диссоциацию комплекса в результате формирования дисульфидных взаимодействий в молекуле ингибиторного протеина [91].

Среди редокс-чувствительных транскрипционных факторов антиоксидант-респонсивный элемент (ARE) занимает ключевые позиции в поддержании гомеостаза при стрессовых, канцерогенных и апоптоз-индуцирующих воздействиях [91, 198]. Показано, что непосредственное действие на клетки HO° , H_2O_2 , NO° и других активных форм кислорода приводит к экспрессии контролируемых ARE генов. Для индукторов ARE характерны электрофильность и способность модифицировать сульфгидрильные группы белков посредством алкилирования, восстановления или окисления. ARE регионы обнаружены в промоторных сайтах нескольких сотен генов, и, что особенно важно, групп ферментов, занимающих ключевые позиции в поддержании и усилении антиоксидантной защиты клеток, а также метаболизма и удаления электрофильных ксенобиотиков и эндогенных токсичных продуктов окисления. ARE контролирует усиление экспрессии ферментов: супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, γ -глутамил-цистеинил-лигазы, тиоредоксина, тиоредоксинредуктазы, глутатион-S-трансферазы, глюкуронилтрансферазы и других [28]. В регулярных участках це-

пей ключевого энзима синтеза GSH-γ-глутамил-цистеинил-лигазы установлены металлчувствительные элементы, ксенобиотик-респонсивный элемент, сайты связывания NF-κB, а также таких факторов транскрипции, как AP-1, AP-2. Это позволяет клеткам повышать концентрацию GSH при действии значительного круга экстремальных воздействий.

В целом под контролем ARE-элемента находятся ключевые пункты синтеза GSH *de novo*, его биорегенерации, удаления из клетки GS-конъюгатов и также ферментов сопряженных биохимических систем. Снижение уровня восстановленного глутатиона приводит к S-тиолированию белков, поскольку свободная сульфгидрильная группа GSH подвергается окислению в первую очередь, защищая от этого другие биомолекулы и функциональные группы.

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о многоуровневом глубоком механизме клеточной защиты в условиях воздействия экотоксикантов и интенсификации окислительных процессов, в котором система глутатиона играет решающую роль для поддержания гомеостаза, особенно при действии тяжелых металлов и других токсичных элементов. В свою очередь, в клетках имеется три основных механизма для поддержания уровня GSH-биосинтез *de novo*, транспорт из внеклеточного пространства через плазматические мембраны и восстановление из окисленной формы с помощью глутатионредуктазы.

* * *

Завершая обзор литературы, следует подчеркнуть опасность токсического действия тяжелых металлов, которые в отличие от органических поллютантов не являются биоразлагаемы и способны накапливаться, как в окружающей среде, так и в биосредах и тканях организма. Прямое токсическое влияние на организм человека и животных оказывают свинец, кадмий, ртуть, мышьяк. В литературе описано остеотоксическое действие ряда металлов на костную ткань, однако патогенетические механизмы их влияния при сочетанной хронической интоксикации изучены недостаточно. Исследование патогенеза металлндуцированных остеопений и поиск возможных путей их коррекции остается актуальной задачей.

В литературе имеются сведения о протективном эффекте применения в клинических условиях и экспериментальных исследованиях веществ антиоксидантного действия – куркумина, Ginkgo biloba, коэнзима CoQ₁₀, мелатонина, цистеина, комплекса других соединений, а также диетотерапии при интоксикации отдельными тяжелыми металлами или смесью солей тяжелых металлов [81, 86, 109, 115, 166, 171, 191].

В механизмах клеточной защиты при воздействии токсикантов и интенсификации окислительных процессов с развитием оксидативного стресса особая роль отводится системе глутатиона. Однако в доступной литературе сведения о значимости этой системы в развитии остеопенического синдрома при действии тяжелых металлов практически отсутствуют, что и стало основной целью данного исследования.

Глава 2 Материалы и методы исследования

У горняков, добывающих медно-цинковую колчеданную руду, основным фактором вредного влияния производственной среды является рудная пыль. Ее выделение сопровождается все этапы технологического процесса, она имеет высокодисперсный характер, оседая на коже, ногтях, волосах, проникая в организм через воздух, воду, пищу, приводит к накоплению в организме тяжелых металлов и других токсичных элементов.

Для моделирования хронической интоксикации элементами медно-цинковой колчеданной руды опытной группе животных ежедневно за час до стандартного кормления перорально в течение трех месяцев вводили суспензию порошка руды в 2% растворе крахмала, из расчета 60 мг/100 г массы животного. В экспериментах использовали образец руды, добываемой на Учалинском месторождении ОАО «Учалинский горно-обогатительный комбинат». Пересчет дозы руды корректировали после очередного взвешивания животного (через каждые 20-22 дня). Вводимую дозу руды рассчитывали по минимальной предельно допустимой концентрации (ПДК) меди и кадмия [69, 71]. Содержание цинка в рудах в среднем составляет 5%, меди – 3%, свинца – 0,1-0,3%, кадмия – 0,06-0,12%, серы – 15-45%, мышьяка – 0,1-3,0%, сурьмы – 0,01-0,5%. Определение содержания ряда элементов в трубчатых костях крыс методом атомно-абсорбционной спектроскопии (Fe, Mg, Mn, Hg, Sr, Cr) и методом вольтамперометрического анализа (Zn, Cu, Cd, Pb) при принятой для экспериментов модели выявило накопление большинства из исследуемых элементов, характеризуя эффективность указанной модели. К концу трёхмесячного введения порошка руды в костной ткани концентрация свинца увеличилась более 19 раз, меди – более 45 раз, ртути – более 5 раз, цинка – более 4 раз, железа и марганца – более 2 раз, хрома и стронция – на 12-15%, содержание магния в костях, наоборот, снизилось почти на 30%. У опытной группы животных обнаружилось значительное накопление в костной ткани кадмия, у животных контрольной группы кадмий практически не определялся [50].

Проведение экспериментов одобрено локальным биоэтическим комитетом ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России.

2.1 Объекты и дизайн исследования

Исследования проведены на 240 белых инбредных половозрелых самцах крыс массой 180-240г. Крысы содержались в идентичных условиях вивария. При проведении экспериментов были соблюдены этические нормы и рекомендации по гуманному отношению к лабораторным животным, в соответствии с Директивой 2010/63 ЕИ по охране животных, используемых в научных целях (Директива) и приказом Минздрава Российской Федерации №199н от 01.04.2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики по содержанию, уходу, кормлению, выводу их из эксперимента и последующей утилизации».

Экспериментальные исследования были проведены в отдельных сериях в два этапа. На первом этапе изучали влияние компонентов медно-цинковой колчеданной руды на интенсивность оксидативных процессов, состояние системы глутатиона, а также ряд других показателей ферментативного и неферментативного звена антиокислительной системы костной ткани и печени. Контрольная группа животных на данном этапе получала ежедневно внутрижелудочно 2% раствор крахмала в адекватном опытной группе крыс объеме в течение трех месяцев.

На втором этапе оценивали профилактический эффект витаминного препарата комплекс витаминов с микроэлементом антиоксидантного действия при ежедневном введении суспензии порошка медно-цинковой колчеданной руды в течение трех месяцев. Антиоксидантный витаминный препарат вводили также ежедневно внутрижелудочно с помощью специального зонда в объеме 1 мл в виде суспензии в 2% растворе крахмала в дозе 50 мг/кг массы крысы в течение последнего месяца на фоне затравки суспензией порошка руды. Крысы контрольной группы также получали адекватный объем 2% раствора крахмала. Одна капсула комплекса витаминов с микроэлементом содержит 40 мг α -токоферола, 100мг ас-

корбиновой кислоты, 10мг β -каротина и 50мкг селена в комплексе с порошкообразными сухими дрожжами. Суточную дозу комплекса витаминов с микроэлементами рассчитывали для крыс с учетом массы и площади поверхности тела с использованием коэффициента пересчета доз согласно «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств». В таблице 1 представлен дизайн исследования.

Животных из эксперимента выводили под наркозом, на первом этапе через 1, 2 и 3 месяца от начала затравки суспензией порошка руды, на втором этапе – через 3 месяца.

Таблица 1 – Дизайн исследования

Этапы исследования	Группа животных	Изучаемые показатели
I. Действие элементов, содержащихся в медно-цинковой колчеданной руде на окислительный статус и систему глутатиона в костной ткани.	1.Контрольная 2.Введение суспензии порошка руды в течение 3-х месяцев	1. В плазме крови: ГВ, ССГ, свободный оксипролин, Са, Р, Mg, активность костной щелочной фосфатазы (КЩФ), С-концевые телопептиды коллагена типа 1 (СТх). 2. В эпифизах бедренных костей: ТБК – активные продукты, кетодиены (КД), диеновые конъюгаты и сопряжённые триены (ДК и СТ), ГВ, ССГ, α - токоферол, аскорбиновая кислота, активность ГПО, ГТ, ГР, ГГТ, Г-6-фДГ, СОД, каталазы и ОАА. 3. В печени: ГВ, ССГ, α -токоферол, аскорбиновая кислота, активность ГПО, ГТ, ГР, ГГТ, Г-6-фДГ, ОАА, СОД и каталазы. 4. Гистологическая и электронно-микроскопическая структура, морфометрические показатели бедренной кости.
II. Эффективность влияния антиоксидантного витаминного препарата на систему глутатиона в костной ткани при интоксикации компонентами медно-цинковой колчеданной руды.	1. Контрольная 2. Введение суспензии порошка руды 3. Введение комплекса витаминов с микроэлементами на фоне интоксикации элементами медно-цинковой колчеданной руды	1. В плазме крови: свободный оксипролин, Са, Р, Mg, β -Cross Laps, активность КЩФ. 2. В эпифизах бедренных костей: ТБК-активные продукты, ДК, КД и СТ, ГВ, ССГ, α -токоферол, аскорбат, активность ГПО, ГТ, ГР, ГГТ, Г-6-фДГ, СОД и каталазы. 3. В печени: ССГ, α -токоферол, аскорбат, активность ГПО, ГТ, ГР, ГГТ, Г-6-фДГ, СОД, каталазы и ОАА.

2.2 Методы исследования

2.2.1 Изучение обмена костной ткани

Для характеристики обмена костной ткани у животных в плазме крови изучали содержание общего кальция, фосфора, магния, С-концевых телопептидов коллагена типа I, активность костного изофермента щелочной фосфатазы и уровень свободного оксипролина.

Содержание общего Са, Р и Mg определяли с использованием наборов реагентов ЗАО «Вектор-Бест» (Россия) «Кальций-Ново», «Фосфор-Ново» и «Магний-Ново».

В основе принципа метода определения Са лежит образование комплекса малинового цвета ионов кальция с индикаторным реагентом арсенозо III в кислой среде, определения Р – образование в кислой среде фосфорно-молибденового комплекса фосфора с молибденовокислым аммонием в кислой среде, определения Mg – образование окрашенного комплекса магния индикаторным реактивом кси-мединовым голубым в щелочной среде. Образовавшиеся комплексы фотометрируются (спектрофотометр СФ-56, ОКБ «Спектр», Россия) при соответствующих длинах волн, расчёт содержания производится с использованием калибраторов.

Определение содержания в плазме крови С-концевых телопептидов коллагена типа I (CTx, CrossLaps) осуществляли с использованием реагентов «Serum Cross Laps™ ELISA» (кат. №AC-02F1) фирмы «БиоХимМак», активности КЩФ – реагентов «Metra BAF EIA» (кат. №8012) фирмы «Quidel Corporation» согласно приложенной инструкции производителя с использованием комплекса приборов для полуавтоматического определения показателей: термостатируемого шейкера «Biosan PLT-4Н», промывателя планшетов «Аквамарин» и планшетного спектрофотометра «Униплан».

Изучение содержания свободного оксипролина (СО) проводили согласно рекомендациям П.Н. Шараева и соавторов [12]. Метод основан на окислении оксипролина хлорамином, продукты реакции при взаимодействии с пара-

диметиламиноазобензальдегидом образуют хромоген красного цвета, уровень которого определяется фотометрически при длине волны 560 нм.

Для определения свободного оксипролина к 1 мл плазмы крови в центрифужной пробирке вносили 0,5 мл 57% раствора хлорной кислоты и 0,5 мл 5% раствора трихлоруксусной кислоты. Пробирку центрифугировали 10 минут при 2800 об/мин. Супернатант отделяли, нейтрализовали по фенолфталеину 6,0 н раствором NaOH и доводили объем дистиллированной водой до 3 мл. В контрольную пробу вносили 3 мл дистиллированной воды.

В обе пробирки (контроль, опыт) приливали по 0,5 мл свежеприготовленного 7% раствора хлорамина Б в 0,1 М фосфатном буфере (pH 8,0), через 5 минут вносили по 0,5 мл 57% раствора хлорной кислоты и 7% раствора парадиметиламинобензальдегида в 96% этаноле. Содержимое тщательно перемешивали и помещали пробирку в кипящую водяную баню (100 °C) на 110-120 сек. В пробирки после охлаждения добавляли по 4,0 мл н-бутанола, встряхивали, центрифугировали в течение 5 мин. при 2800 об/мин. Верхнюю фазу отсасывали в отдельную пробирку и фотометрировали при длине волны 560 нм опыт против контроля. Содержание оксипролина рассчитывали по калибровочному графику. Для построения калибровочного графика использовали растворы, содержащие 0,04, 0,08, 0,12 и 0,24 мкмоль гидроксипролина («Sigma», США) в 1 мл дистиллированной воды.

2.2.2 Изучение содержания продуктов перекисного окисления липидов

Интенсивность течения оксидативных процессов в костной ткани оценивали по содержанию продуктов перекисного окисления липидов: кетодиенов, диеновых конъюгатов и сопряжённых триенов в гептан-изопропаноловых экстрактах по спектрофотометрическому методу, описанному И.А. Волчегорским и соавторами [80], и ТБК-активных соединений с использованием наборов реагентов «ТБК-АГАТ» фирмы ООО «АГАТ-МЕД».

Метод определения первичных (диеновые конъюгаты, ДК) и вторичных продуктов (кетодиены и сопряженные триены, КД и СТ) липопероксидации основан на том, что липиды экстрагируются смесью гептана и изопропанола, которые впоследствии разделяются. В гептановой фазе при этом концентрируются преимущественно нейтральные липиды (триглицериды, эфиры холестерина, соли свободных жирных кислот), а в изопропаноловую фазу – полярные (дифильные) липиды (фосфолипиды, сфинголипиды). В обеих липидных фазах измеряется оптическая плотность при длинах волн 220 нм, 232 нм и 278 нм. При 220 нм определяется уровень изолированных двойных связей ацильных радикалов липидов, при 232 нм – ацилгидропероксидов и диеновых конъюгатов, при 278 нм – кетодиенов и сопряженных триенов. Содержание продуктов липопероксидации рассчитывается в условных единицах (усл. ед.) как величина отношения E_{232}/E_{220} и E_{278}/E_{220} соответственно каждой фазы.

Для определения продуктов ПОЛ и других биохимических показателей получали гомогенат эпифизов бедренной кости и печени. Навеску тканей (1,0 и 0,5 г соответственно) измельчали ножницами и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе на холоде (2-4°C) с 5,0 мл 0,1м калий-фосфатного буфера pH 7,4. Для более полного разрушения клеток и субклеточных структур вносили детергент (третон X-100) до конечной концентрации 0,1%, перемешивали, оставляли на холоде на 30 мин., переносили в центрифужную пробирку, центрифугировали (центрифуга Hitachi Nimaе CT15RE, Япония), надосадочную жидкость отделяли в отдельную пробирку и использовали для исследований.

При изучении содержания продуктов ПОЛ, в центрифужную пробирку вносили 0,2 мл гомогената, добавляли 6 мл смеси гептан-изопропанол (2:1 по объему) и экстрагировали встряхиванием в шуттель-аппарате 30 минут и центрифугировали. Надосадочную жидкость переносили в отдельную пробирку, затем в содержимое пробирок вносили по 1,0 мл 1,0н раствора HCl, интенсивно перемешивали и для разделения фаз оставляли на 30 минут, верхнюю гептановую фазу переносили в чистую пробирку, а к нижнему слою добавляли 1,0г сухого хлористого натрия для обезвоживания.

Контрольную пробу готовили параллельно по той же схеме с добавлением вместо гомогената 0,2 мл дистиллированной воды. В каждой фазе липидного экстракта измеряли оптическую плотность опыта против контроля при 220 нм, 233 нм и 278 нм.

В основе метода определения ТБК-активных продуктов положена реакция продуктов ПОЛ (малоновый диальдегид, 4-гидроксиноненаль и др.) с тиобарбитуровой кислотой с образованием окрашенного комплекса, который экстрагируется бутиловым спиртом и определяется фотометрически при измерении поглощения при длинах волн 535 нм и 570 нм.

В две центрифужные пробирки (опыт, контроль) вносили по 3,0 мл 1,4% раствора ортофосфорной кислоты, добавляли в опыт 0,25 мл гомогената ткани, в контроль – 0,25 мл дистиллированной воды. В обе пробирки прибавляли по 1,0 мл 0,6% раствора тиобарбитуровой кислоты (ТБК), накрывали конденсирующими колпачками, помещали в кипящую водяную баню на 45 минут. Пробирки охлаждали и добавляли в содержимое по 4,0 мл н-бутанола, интенсивно перемешивали, центрифугировали 10 минут при 2800 об/мин. Супернатант отбирали и измеряли оптическую плотность опыта против контроля. Расчет осуществляли по формуле: $C = D_{535} - D_{570} / 0,156 \cdot 16 \cdot A$, (1)

где C – содержание ТБК-активных продуктов в мкмоль/мг белка; D_{535} и D_{570} – оптическая плотность проб при 535 нм и 570 нм; 0,156 – коэффициент молярной экстинкции комплекса малоновый диальдегид – тиобарбитуровая кислота в мкмоль/см; 16 – коэффициент разведения образца; A – содержание белка в г ткани.

2.2.3 Исследование системы глутатиона, других показателей ферментативного и неферментного звеньев антиоксидантной защиты

Определение содержания восстановленного глутатиона (ГВ) осуществляли по методике, описанной А.Н. Гавриловой в модификации [34] (Карпищенко

А.И. и др., 1997) с использованием 5,5'-дитио-бис (-2-нитробензойной) кислоты (ДТНБ).

В центрифужную пробирку вносили 0,6 мл плазмы крови или гомогената ткани добавляли 0,2 мл 20% раствора сульфасалициловой кислоты, центрифугировали 10 минут при 2800 об/мин. 0,2 мл супернатанта переносили в пробирку, содержащую 2,25 мл 0,1 М ТРИС-НСl буфера рН 8,5 с 0,01% ЭДТА, добавляли 25 мкл раствора ДТНБ (40 мг ДТНБ растворенного в 10 мл метанола). После развития окраски пробу фотометрировали при длине волны 412 нм против дистиллированной воды. Расчёт осуществляли по калибровочному графику с учётом разведения и выражали в мкмоль/мг белка.

Содержание свободных сульфгидрильных групп в белках (ССБ) определяли по методу G. Bellomo et al. [95] с использованием 5,5'-дитио-бис(-2-нитробензойной) кислоты.

К 0,1 мл плазмы крови гомогената ткани в центрифужной пробирке добавляли 0,1 мл калий-фосфатного буфера рН 7,4 или к 0,05 гомогената печени - 0,15 мл калий-фосфатного буфера рН 7,4, вносили в пробирку 0,1 мл 10% раствора хлорной кислоты и центрифугировали 10 минут при 2800 об/мин. Надосадочную жидкость удаляли. К осадку приливали 0,5 мл дистиллированной воды, взмучивали стеклянной палочкой и вновь центрифугировали в течение 10 минут при 2800 об/мин. Надосадочную жидкость декантировали. Подобную промывку осадка водой повторяли еще раз.

Осадок солюбизировали в 2,5 мл 0,5 М ТРИС-НСl буфера рН 8,8, содержащего ЭДТА и додецил-сульфата (1 л буфера содержит 5 ммоль ЭДТА и 10 г додецил-сульфата натрия). 1,0 мл раствора переносили в чистую пробирку, добавляли 25 мкл метанолового раствора ДТНБ и после развития окраски фотометрировали при 412 нм против оставшейся части солюбилизата.

Концентрацию SH-групп рассчитывали по калибровочному графику, построенного с использованием восстановленного глутатиона, и выражали в мкмоль/мг белка.

Содержание α -токоферола определяли по методу I.D. Desai [118]. Принцип метода основан на восстановлении ионов железа в присутствии витамина Е с образованием комплексного соединения с батофенантролином.

1,5 мл гомогената вносили в центрифужную пробирку, добавляли 1,0 мл абсолютного спирта и 0,5 мл 1% раствора аскорбиновой кислоты. Пробу помещали в водяной термостат (70°C) и по истечению 5 минут добавляли 1,0 мл 1,0 н раствора КОН и продолжали инкубировать при 70°C в течение 30 минут. Пробирку охлаждали, добавляли для экстракции α -токоферола 4,0 мл гексана, содержимое перемешивали на вортексе, центрифугировали 5 минут при 2500 об/мин и верхний гексановый слой переносили в чистую пробирку. В термостате при 35°C растворитель (гексан) испаряли и к остатку в пробирку вносили 1,0 мл этанола (96°C). В элюате определяли содержание α -токоферола.

Для этого в пробирку (опыт), и контроль, содержащий 1,0 мл этанола, добавляли по 0,2 мл 0,2% раствора батофенантролина, перемешивали, вносили по 0,2 мл 0,1 % хлорида железа (FeCl_2) и через 1,0 минуту приливали по 0,2 мл ортофосфорного реагента.

Содержимое пробирок фотометрировали опыт против контроля при длине волны 536 нм. Расчет уровня α -токоферола осуществляли по калибровочному графику, построенному при определении экстинкции образцов с известным содержанием витамина Е. Содержание витамина Е выражали в мкг/мг белка.

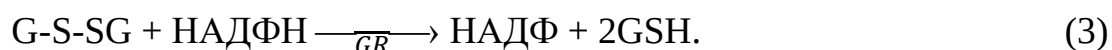
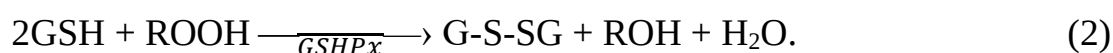
Содержание аскорбиновой кислоты в тканях определяли, используя метод, описанный S.T. Omaye et al. [173]. Метод основан на количественной оценке интенсивности восстановления железа аскорбиновой кислотой с образованием дипиридилного комплекса, определяемого при длине волны 525 нм.

К 0,5 мл гомогената ткани в центрифужной пробирке добавляли 0,5 мл 10% раствора трихлоруксусной кислоты, перемешивали и центрифугировали при 2800 об/мин в течение 10 минут. 0,27 мл надосадочной жидкости переносили в отдельную центрифужную пробирку, вносили в нее 0,08 мл 85% (концентрированной) ортофосфорной кислоты, 1,37 мл 5% раствора дипиридила и 0,28 мл 1% раствора хлорида железа. Инкубировали в течение 60 минут при комнатной температуре и

центрифугировали 10 минут при 2800 об/мин. Супернатант переносили в другую пробирку и оценивали оптическую плотность при 525 нм против дистиллированной воды. Расчет содержания витамина С осуществляли по калибровочному графику, построенному с использованием стандартных растворов проб, подвергнутых аналогичной процедуре определения. Концентрацию аскорбата выражали в мкг/мг белка.

Определение активности глутатионпероксидазы (ГПО, GSHPx) [КФ 1.11.1.9] осуществляли с помощью набора реагентов «Glutathione Peroxidase» фирмы «Randox Laboratories Ltd.», (Дания), согласно прилагаемой инструкции.

Принцип метода основан на том, что ГПО с помощью гидроперекиси кумина катализирует окисление глутатиона восстановленного. В присутствии глутатионредуктазы (ГР) и НАДФН окисленный глутатион вновь восстанавливается с образованием НАДФ⁺, что сопровождается снижением абсорбции при 340 нм.



0,05 мл гомогената ткани (проба) и 0,05 мл дистиллированной воды (контроль) в двух пробирках смешивали соответственно с 1,0 мл агента разведения, через 5 минут вносили по 1,0 мл реактива Драбкина и добавляли по 2,5 мл реагента (глутатион восстановленный 4 ммоль/л, глутатионредуктаза $\geq 0,5$ Ед/л, НАДФН 0,34 ммоль/л в фосфатном буфере рН 7,4). Содержимое пробирок переносили в кюветы спектрофотометра, вносили по 0,1 мл раствора кумина, перемешивали и через 1 минуту измеряли начальную абсорбцию пробы и контроля при длине волны 340 нм (E_0), через еще 1 минуту измеряли - получали E_1 , еще через 1 минуту после измерения получали экстинкцию E_2 .

Расчет осуществляли по формуле:

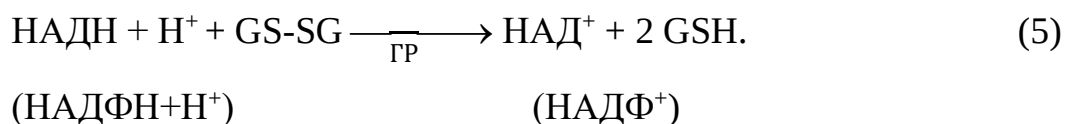
$$\text{С нмоль}/(\text{мин} \times \text{мг белка}) = 8412 \times (E_1 - E_0) + (E_2 - E_1)/2 \times a, \quad (4)$$

где 8412 – коэффициент, учитывающий объем проб и молярную экстинкцию образования НАДФ⁺, а – содержание белка в мг/мл гомогената.

Определение активности глутатион-S-трансферазы (ГТ, GST) [КФ 2.5.1.18] осуществляли по W.H. Habig et al. (1973). Принцип метода основан на каталитическом действии ГТ на 1-хлор-2,4-динитробензол (ХДНБ) в присутствии восстановленного глутатиона с образованием продукта, имеющего максимум поглощения при длине волны 340 нм.

В 2 кювета спектрометра (опыт и контроль) вносили по 1,2 мл 2 мМ раствора глутатиона в 0,1 М калий-фосфатном буфере pH 6,5 в опыт добавляли 0,1 мл гомогената ткани, в контрольную пробу вносили 0,1 мл дистиллированной воды. Реакцию запускали добавлением в пробы (опыт и контроль) по 1,2 мл 2 мМ раствора ХДНБ (10 мг ХДНБ растворяли в 1 мл метанола и к спиртовому раствору добавили 23 мл калий-фосфатного буфера pH 6,5). Измерение оптической плотности проводили при длине волны 340 нм сразу после начала реакции и через 3 минуты. Расчет активности производили с учетом коэффициента молярной экстинкции образовавшегося продукта $2600 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$, степени разведения, времени инкубации и содержания белка в гомогенате ткани. Активность энзима выражали в нмоль/(мин×мг белка).

Активность глутатионредуктазы (ГР, GSHR) [КФ 1.6.4.2] проводили с помощью метода, описанного E. Beutler [97]. Метод основан на восстановлении окисленного глутатиона под действием ГР при участии НАДН или НАДФН в качестве донора протонов и электронов. Активность фермента измеряется по снижению абсорбции раствора по мере окисления восстановленных пиридиннуклеотидов



В 2 кюветы спектрофотометра (опыт и контроль) вносили по 1,0 мл 1,0 М ТРИС-HCl буфера, содержащего 5 мМ ЭДТА, pH 8,0 и по 0,02 мл разведенного в 10 раз 0,1 М в калий-фосфатном буфере pH 7,4 гомогената ткани. В опытную пробу добавляли 0,2 мл 0,033 М раствора окисленного глутатиона, нейтрализованного до pH 7,4, в контроль – 0,2 мл дистиллированной воды.

Реакцию запускали внесением в пробы по 0,1 мл 2 мМ раствора НАДФН, растворенного в 10 мМ ТРИС-НСl буфере рН 7,0. Инкубацию проводили в течение 5 минут. Измерение оптической плотности проводили при длине волны 340 нм опыт против контроля. Расчет активности фермента производили с учетом миллимолярного коэффициента абсорбции для НАДФН – $12,44 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, разведения гомогената, времени инкубации и содержания белка в пробе. Активность фермента выражали в нмоль/(мин×мг белка).

Определение активности гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТ) [КФ 2.3.2.2] производили по методу М. Orłowski, А. Meister [174] с использованием в качестве субстрата L-γ-глутамил-р-нитроанилина.

В 2 пробирки вносили по 1,0 мл ТРИС-НСl буфера, приливали по 0,5 мл субстрата, 2,2 мл 0,55 М глицил-глицина рН 8,3. В опытную пробу добавляли 0,2 мл гомогената ткани, в контрольную – 0,2 мл дистиллированной воды и инкубировали 30 минут при 37°C. Затем вносили по 3,0 мл 10% уксусной кислоты и фотометрировали при длине волны 410 нм.

Активность фермента рассчитывали с использованием калибровочного графика и выражали в нмоль/мин×мг белка.

Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-фДГ) [КФ 1.1.1.49] изучали по методу G. Glock and D. Mc Leon (1953) в модификации [7] (Асатиани В.С., 1969), основанного на спектрофотометрическом определении содержания НАДФН при окислении глюкозо-6-фосфата в 6-фосфоглюконат при длине волны 340 нм.

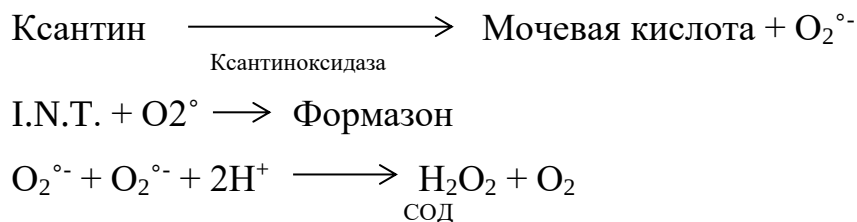
В кювету спектрофотометра вносили инкубационную среду, содержащую 2,9 мл триэтаноламинового буфера рН 7,5 0,1 мл 0,03 М раствора НАДФ⁺ и 0,02 мл гомогената ткани. Среду перемешивали и оставляли на 5 минут. Вносили в пробу 0,05 мл 0,04 м раствор динатриевой соли глюкозо-6-фосфата и сразу измеряли оптическую плотность при длине волны 340 нм. Через 5 минут производили повторное измерение. Активность фермента рассчитывали по формуле:

$$A = \frac{\frac{\Delta E}{\text{мин}} \times 3,07 \times 50}{6,22 \times 6,22 \times V}, \quad (6)$$

где A – активность фермента в мкмоль/(мин×мг белка); ΔE – разность экстинкций абсорбции в конце и начале пробы; 3,07 – объем пробы; 50 – коэффициент пересчета в мл на гомогенат ткани; 6,22 – миллимолярная экстинкция поглощения НАДФН; V – содержание белка в гомогенате в мг/мл.

Определение активности супероксиддисмутазы (СОД) [КФ 1.15.1.1.] проводили с использованием набора реагентов «RANSOD» (Randox Laboratories Ltd., Дания).

Принцип метода основан на том, что ксантиноксидаза окисляет ксантин с образованием пероксида водорода, который в реакции с хлоридом 2-(4-йодофенил)-3-(4-нитрофенол)-5-фенилтетразолия (I.N.T.) образует формазон красной окраски. СОД активирует превращение супероксиданионрадикала ($O_2^{\circ-}$) в пероксид водорода и молекулярный кислород и, таким образом, ингибирует образование формазона, снижая уровень H_2O_2 . Активность СОД измеряется степенью ингибирования реакции:



За единицу активности фермента принимается количество СОД, которое вызывает угнетение образования формазона на 50%.

В 2 пробирки вносили по 0,05 мл стандарта, содержащего ксантин и I.N.T., в пробу (гомогенат ткани), в контроль разбавителя проб, прибавляли по 0,25 мл раствора ксантиноксидазы, перемешивали и через 30с. определяли на спектрофотометре при длине волны 505 нм A_1 , а через 3 мин. – A_2 . Содержание супероксиданионрадикала в пробе и стандарте вычисляли по формуле: $A_2 - A_1/3 = \Delta A \times S/\text{мин}$, где S – разбавитель проб. Интенсивность ингибирования реакции СОД рассчитывали по формуле: $100 - (\Delta A_{\text{станд}} \text{ или } \Delta A_{\text{проб}})/\text{мин} / \Delta A \times S / \text{мин} \times 100 = \% \text{ ингибирования}$.

Для определения активности фермента в Ед/мл строили график процентного ингибирования для каждой точки стандарта в шкале $\text{Log } 10$ (концентрация стан-

дарт СОД в Ед/мл). Для расчета в тканях переводили активность СОД на мг белка в пробе.

Определение активности каталазы [КФ 1.11.1.6] проводили по методу, описанному М.А. Королук и соавт. [39]. Пероксид водорода образует стойкий окрашенный комплекс с солями молибдена. В присутствии каталазы вследствие разложения H_2O_2 интенсивность окрашивания раствора снижается.

В две центрифужные пробирки (опыт, холостая проба) вносили по 2,0 мл 0,03% раствора пероксида водорода. В холостую пробу прибавляли 0,1 мл дистиллированной воды, реакцию в опытной пробирке запускали добавлением 0,1 мл гомогената ткани. Через 10 мин. реакцию останавливали добавлением в пробирки по 1,0 мл 4% раствора молибдата аммония и 0,5 мл 20% раствора трихлоруксусной кислоты. Пробирки центрифугировали 10 мин. при 2800 об/мин. Интенсивность окраски в пробирках измеряли при длине волны 410 нм против контроля, содержащей все компоненты реакции кроме H_2O_2 (вместо раствора H_2O_2 вносили 2,0 мл калий-фосфатного буфера pH 7,4).

Активность фермента рассчитывали по формуле:

$$A = (E_{\text{хол.}} - E_{\text{опыт.}}) \times V \times t \times K/a, \quad (7)$$

где A – активность каталазы в мкмоль/мин × мг белка; $E_{\text{хол.}}$ и $E_{\text{опыт.}}$ – экстинкции холостой и опытной проб; V – объем вносимой пробы в мл; t – время инкубации в минутах; K – коэффициент микромолярной экстинкции, равной 36,51; a – концентрация белка в гомогенате в мг/мл.

Общую антиокислительную активность (ОАА) в гомогенате тканей оценивали с использованием системы, содержащей липопротеины желтка куриного яйца, полученные путем гомогенизации в 20-кратном калий-фосфатном буфере pH 7,4, по методу, описанному Г.И. Клебановым и соавторами [52].

В пробирки, содержащие по 2,0 мл системы желточных липопротеинов добавляли 0,5 мл гомогената ткани (опыт) и 0,5 мл дистиллированной воды (контроль), вносили по 0,1 мл раствора, содержащего 50 ммоль $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, для индуцирования липопероксидации и через 5 минут в центрифужные пробирки (опыт, контроль) переносили по 0,25 мл образца, в которых определяли содержа-

ние ТБК-реагирующих веществ (см. выше). Расчет осуществляли по формуле путем вычисления процентного торможения пероксидации в присутствии гомогената ткани: $OAA = (ТБК - AP_{контр.} - ТБК - AP_{контр.}) / ТБК - AP_{контр.} \times 100.$ (8)

Определение содержания белка в гомогенатах тканей проводили по методу Лоури [178] (Peterson G.L. et al., 1997). Принцип метода основан на биуретовой реакции белков с ионами меди с последующим восстановлением реактива Фолина (фосфорновольфрамовомолибденовый реактив) в щелочной среде, повышающий чувствительность биуретовой реакции в сто раз и позволяющий определить содержание 0,2 мкг белка в пробе.

Содержание белка определяли по калибровочному графику, построенному с содержанием бычьего альбумина от 5 мкг/мл до 100 мкг/мл.

2.2.4 Гистологические методы исследования¹

У животных была изучена гистологическая и электронно-микроскопическая картина диафизов и эпифизов бедренных костей через 1, 2 и 3 месяца после начала внутрижелудочного введения суспензии порошка руды. Фрагменты эпифиза и диафиза кости фиксировали в 10% растворе забуференного формалина по Лилли (3-4 суток), декальцинировали в 10% растворе муравьиной кислоты, разведенной в формалине той же концентрации 1,5 – 2 месяца [65]. После декальцинации кости промывали в 10% растворе забуференного формалина по Лилли и обезвоживали в спиртах восходящей концентрации (от 70 % до 100 %) и заливали в парафин по стандартной методике. Гистологические срезы готовили на микротоме «LECA4RM2145» (Германия) толщиной 5-6 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином по Ван-Гизону.

Исследование и визуализацию препаратов проводили с использованием микроскопа «Carl Zeiss Axio Imager – Z1» (Германия). Фотографировали с использованием окуляра 10 и объективов х 4, 10, 20 и 40. Микрофотосъемку проводили

¹ Выражаем благодарность доктору биологических наук, профессору Л.А. Мусиной, ведущему научному сотруднику отдела морфологии Всероссийского центра глазной и пластической хирургии МЗ РФ (г. Уфа) за помощь при выполнении данного раздела работы

с помощью цифровой камеры Nikon D100 (Германия). Морфометрические исследования проводили в 10 полях зрения при увеличении $\times 20$, $\times 100$.

Для электронно-микроскопического изучения после вышеописанной декальцинации и промывки в забуференном формалине по Лилли кусочки костной ткани (1-2 мм) фиксировали в 2% растворе глутарового альдегида на фосфатном буфере Миллонига (pH 7,2-7,4) в течение двух часов и 1 час постфиксировали в 1% растворе четырехоксида осмия (приготовленном на том же буфере). Обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и абсолютном ацетоне. Заливку проводили в эпон-812 по общепринятой методике [73]. Ультратонкие среды получали на ультрамикротоме «LKB – III» (Швеция), контрастировали 2% водным раствором уранилацетата и раствором цитрата свинца по Рейнольдсу (Reynolds E.S., 1963). Фотографировали срезы в электронном микроскопе «Jem-100B» (Япония) при увеличении 2500-10000.

2.3 Статистическая обработка результатов

Обработку результатов осуществляли с использованием пакета программ Statistica 6,0 for Windows. Тип распределения для выборок определяли с помощью критерия Шаниро-Уилка. Если при этом признак соответствовал закону нормального распределения в группах рассчитывали выборочную среднюю $\bar{X}$ и стандартную ошибку средней (s_x), в случае ассиметричного распределения признаков в группах выборки определяли медиану (Me), и процентиля (Q_1 и Q_3). Статистические различия межгрупповых средних величин оценивали по t-критерию Стьюдента при нормальном распределении и U-критерию Манна-Уитни. Корреляционные связи между признаками оценивали расчётом коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$ [23].

Глава 3 Результаты собственных исследований

3.1 Влияние элементов медно-цинковой колчеданной руды на некоторые показатели обмена костной ткани в плазме крови экспериментальных животных

Для оценки состояния обмена костной ткани используются методы, которые условно можно разделить на 3 группы:

- характеристика фосфорно-кальциевого обмена;
- определение биохимических маркеров метаболизма костного матрикса;
- изучение системных и «короткодистантных» регуляторных факторов обмена костной ткани.

К первой групп относятся определение общего и ионизированного кальция, фосфора и магния в плазме крови, суточной экскреции кальция и фосфора с мочой, определение экскреции кальция с мочой по отношению к концентрации креатинина.

Биохимическими маркерами резорбции кости являются в основном различные фрагменты коллагена типа I, костная тартрат-резистентная кислая фосфатаза, попадающие в кровоток из зоны резорбции. Среди продуктов деградации наиболее часто определяются гидроксипролин в крови и моче, а также фрагменты, в состав которых входят поперечные сшивки, соединяющие молекулы зрелого коллагена, – пиридинамин и дезоксипиридинамин, N- и C- концевые телопептиды коллагена (NTx, CTx), костный сиалопротеин, склеростин и др. Маркерами костеобразования являются остеокальцин, костный изофермент щелочной фосфатазы (КЩФ), аминок- и карбокситерминальные пропептиды проколлагена типа I (PINP, PICP).

В наших исследованиях были изучены содержание в плазме крови свободного оксипролина, C-концевых телопептидов коллагена типа I и активность костной щелочной фосфатазы, а также уровни общего Ca, P и Mg.

В таблице 2 приведены результаты изучения маркёров ремоделирования костной ткани в плазме крови при трехмесячном ежедневном внутривенном введении суспензии порошка медно-цинковой колчеданной руды. Содержание свободного оксипролина через месяц после начала введения порошка руды увеличивается и в последующие сроки наблюдения остаётся статически значимо повышенным.

Таблица 2 – Содержание в плазме крови экспериментальных животных маркёров ремоделирования костной ткани при действии элементов, содержащихся в медно-цинковой колчеданной руды, Me [Q₁-Q₃]

Показатели	Контрольная группа, n=10	Опытная группа		
		Через 1 месяц, n=10	Через 2 месяца, n=10	Через 3 месяца, n=10
Свободный оксипролин, мкмоль/л	13,2 [12,4-15,1]	16,8 [14,5-17,8] PU=0,0442	16,7 [14,5-17,9] PU=0,0478	17,4 [15,6-18,2] PU=0,0381
СТх, нг/л	0,667 [0,498-0,705]	0,934 [0,722-1,213] PU=0,0367	1,189 [1,026-1,317] PU=0,0296	1,244 [1,034-1,407] PU=0,0288
КЩФ, Ед/л	5,81 [3,81-6,93]	6,96 [4,91-7,58] PU=0,0484	5,95 [4,15-6,93] PU=0,8036	5,52 [4,33-6,87] PU=0,3427

Примечание: в данной и последующих таблицах PU – различия с контрольной группой.

Это свидетельствует об усилении тканевой деградации коллагена при длительном действии компонентов медно-цинковой колчеданной руды. Изучение маркёра резорбции костной ткани подтверждает данную версию. Через месяц содержание С-концевых телопептидов коллагена типа I повышается почти в 1,5 раза, а в последующие месяцы наблюдения несколько увеличивается. Уровень маркёра костеобразования – КЩФ при этом в первый месяц наблюдения возрастает, однако через 2 и 3 месяца введения руды снижается и статистически значимо не отличается от показателя контрольных животных (Рисунок 2).

Таким образом, полученные данные позволяют прийти к заключению о том, что под влиянием элементов, содержащихся в медно-цинковой колчеданной руде,

наблюдается нарушение баланса костного ремоделирования с превалированием процессов резорбции.

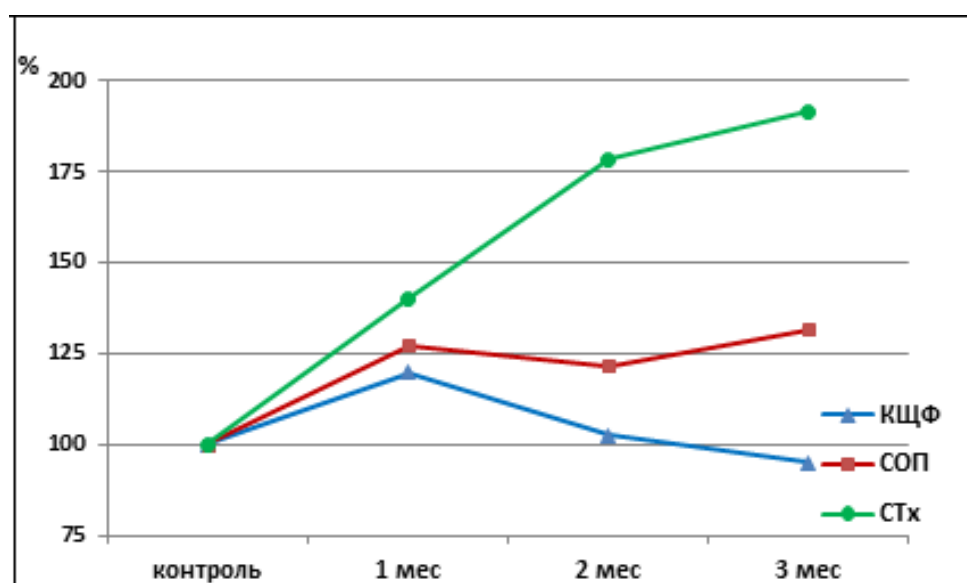


Рисунок 2 – Динамика изменений содержания маркёров ремоделирования костной ткани в плазме крови экспериментальных животных при интоксикации элементами руды (в % к контролю, принятому за 100%).

Результаты изучения показателей минерального обмена также свидетельствуют о нарушении костного метаболизма (Таблица 3).

Таблица 3 – Влияние элементов медно-цинковой колчеданной руды на показатели минерального обмена в плазме крови экспериментальных животных, $\bar{X} \pm s_x$.

Показатели	Группа животных			
	Контроль- ная, n=10	Опытная		
		Через 1 месяц, n=10	Через 2 месяца, n=10	Через 3 месяца, n=10
Са общий, ммоль/л	2,43±0,102	2,58±0,080 p=0,112	2,04±0,103 p=0,068	2,02±0,102 p=0,042
P, ммоль/л	1,35±0,081	1,38±0,053 p=0,806	1,22±0,074 p=0,216	1,08±0,066 p=0,038
Mg, ммоль/л	0,82±0,064	0,85±0,058 p=0,628	0,89±0,060 p=0,416	0,98±0,061 p=0,048

У животных опытной группы по мере удлинения срока интоксикации компонентами руды наблюдается первоначальное повышение в плазме крови содер-

жания Са и Р, которое затем снижается, достигая статистической значимости по сравнению с показателями группы контроля. Уровень Mg при этом постепенно увеличивается, что приводит к снижению соотношения Са/Mg с $2,96 \pm 0,144$ до $2,06 \pm 0,128$ ($P < 0,05$) через 3 месяца от начала введения суспензии порошка руды.

3.2 Интенсивность перекисного окисления липидов в костной ткани при действии элементов, содержащихся в медно-цинковой колчеданной руде

Выраженность свободно-радикальных процессов в костной ткани оценивали по содержанию продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) – диеновых конъюгатов (ДК), кетодиенов и сопряженных триенов (КД и СТ) в гептан-изопропаноловом экстракте липидов и ТБК-активных соединений (ТБК-АП) в гомогенатах эпифизов бедренных костей. Результаты исследования представлены в таблице 4 и рисунке 3.

Таблица 4 – Содержание продуктов перекисного окисления липидов в эпифизах бедренных костей крыс при действии компонентов медно-цинковой колчеданной руды, Ме [Q₁-Q₃]

Показатели	Контрольная группа, n=10	Опытная группа		
		Через 1 месяц, n=10	Через 2 месяца, n=10	Через 3 месяца, n=10
ДК гепт.фазы, у.е./г ткани	0,76 [0,7-0,84]	0,98 [0,88-1,07] PU=0,0688	1,09 [0,91-1,16] PU=0,0114	1,13 [1,03-1,25] PU=0,0087
КД и СТ гепт.фазы, у.е./г ткани	0,62 [0,55-0,67]	0,72 [0,64-0,80] PU=0,0483	0,80 [0,72-0,87] PU=0,0311	0,96 [0,77-1,03] PU=0,0017
ДК изопр.фазы, у.е./г ткани	0,96 [0,92-0,99]	1,52 [1,38-1,59] PU=0,0316	1,56 [1,33-1,62] PU=0,0244	1,61 [1,48-1,73] PU=0,0019
КД и СТ изопр.фазы, у.е./г ткани	0,71 [0,63-0,77]	0,76 [0,72-0,83] PU=0,6954	0,88 [0,79-0,97] PU=0,0402	1,27 [1,09-1,56] PU=0,0072
ТБК-АП, нмоль/г ткани	1,72 [1,38-1,86]	2,42 [2,32-2,66] PU=0,0354	2,44 [2,31-2,97] PU=0,0372	3,93 [3,74-4,22] PU=0,0008

При действии элементов, содержащихся в медно-цинковой колчеданной руде, в костной ткани активируются процессы свободно-радикального окисления. Об этом свидетельствует, увеличение содержания всех изучаемых продуктов липопероксидации. Динамика изменений уровня первичных (ДК) и вторичных продуктов ПОЛ при этом имеет некоторые различия. При введении порошка руды в конце первого месяца наблюдается преимущественно возрастание содержания диеновых конъюгатов в гептановой и изопропаноловых фазах, а через 2 и 3 месяца интоксикации их уровень существенно не изменялся ($p < 0,05$). Вторичные продукты липопероксидации – КД и СТ, ТБК-АП увеличивались постепенно по мере удлинения сроков интоксикации, как в гептановой, так и изопропаноловых фазах липидного экстракта.

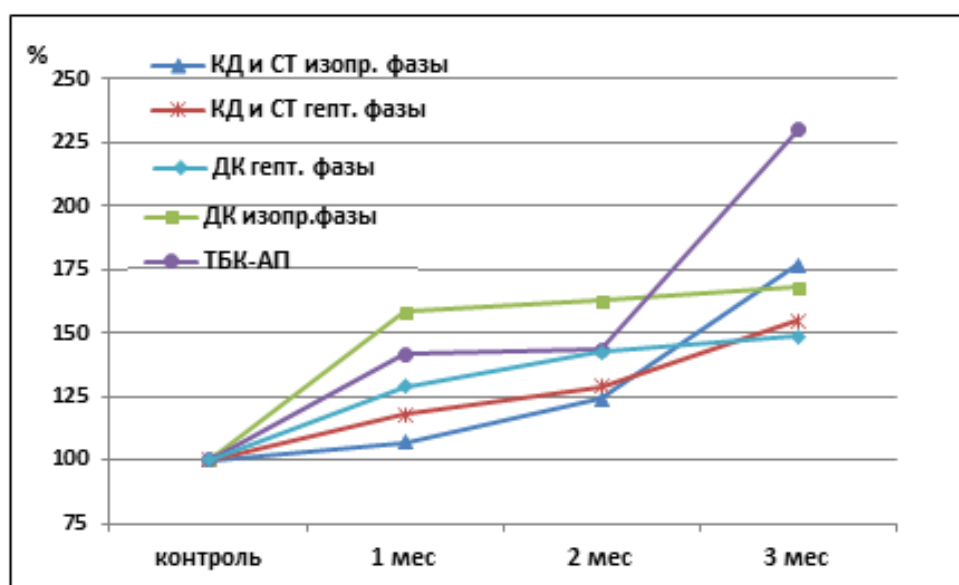


Рисунок 3 – Динамика изменений содержания продуктов липопероксидации в эпифизах бедренной кости крыс при действии элементов, содержащихся в медно-цинковой колчеданной руде (в % к контролю, принятому за 100%).

В гептановую фазу липидного экстракта ткани при этом преимущественно экстрагируются нейтральные липиды (триацилглицериды, эфиры холестерина и др.), а в изопропаноловую фазу – дифильные липиды (фосфолипиды, сфинголипиды и др.).

Наиболее выражено увеличивается уровень соединений, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, включающие малоновый диальдегид, 4-гидрокси-нонаниель, карбонильные остатки радикалов аминокислот в белках, пептидах и другие продукты.

Таким образом, при длительном поступлении в организм элементов, содержащихся в медно-цинковой колчеданной руде, в костной ткани наблюдается интенсификация процессов свободно-радикального окисления, которые в физиологических условиях контролируются антиоксидантной защитой, включающей систему глутатиона и другие компоненты его неферментативного и ферментативного звеньев.

3.3 Система глутатиона и другие компоненты антиоксидантной защиты в костной ткани экспериментальных животных при действии элементов медно-цинковой колчеданной руды

В таблице 5 приведены результаты определения показателей системы глутатиона при длительной внутрижелудочной интоксикации экспериментальных животных суспензией порошка медно-цинковой колчеданной руды, которые свидетельствуют о значительном снижении в костной ткани содержания восстановленного глутатиона.

Уровень ГВ через месяц после начала эксперимента падает до 69,1% от контроля, несколько увеличивается к концу второго месяца и вновь снижается до 59,9% через 3 месяца интоксикации. Содержание свободных сульфгидрильных групп белков снижается более медленно и в меньшей степени.

Одновременно с содержанием восстановленного глутатиона в костной ткани снижается активность ферментов, функционально связанных с ним – ГПО, ГТ и ГГТ. Выраженность и динамика изменений их каталитической активности существенно отличаются. Через один месяц после начала внутрижелудочной заправки суспензией порошка руды на фоне резкого падения активности ГПО ак-

тивность глутатион-S-трансферазы сохраняется на физиологическом уровне и постепенно снижаются до 81,5% к концу трёхмесячной затравки животных.

Таблица 5 – Действие компонентов медно-цинковой колчеданной руды на систему глутатиона в костной ткани крыс, Me [Q₁-Q₃]

Показатели	Контрольная группа, n=10	Опытная группа		
		Через 1 месяц, n=10	Через 2 месяца, n=10	Через 3 месяца, n=10
ГВ, мкмоль/мг белка	2,62 [1,99-3,24]	1,81 [1,51-2,20] PU=0,0104	2,02 [1,59-2,10] PU=0,0503	1,57 [1,30-1,82] PU=0,0043
ССГ, мкмоль/мг белка	8,0 [6,85-10,2]	7,7 [6,72-9,8] PU=0,6018	7,05 [5,08-9,41] PU=0,1804	6,09 [5,2-9,62] PU=0,0281
ГПО, нмоль/мин×мг белка	2,52 [1,89-3,16]	1,44 [1,16-1,58] PU=0,0141	1,75 [1,52-2,02] PU=0,050	1,57 [1,32-1,77] PU=0,0211
ГТ, нмоль/мин×мг белка	16,2 [15,1-20,3]	16,1 [13,2-21,2] PU=0,8941	14,7 [13,9-17,8] PU=0,0443	13,2 [11,6-17,0] PU=0,0222
ГР, нмоль/мин×мг белка	4,18 [3,78-4,48]	3,56 [2,36-3,82] PU=0,1332	3,69 [3,51-4,09] PU=0,3843	3,43 [2,75-4,03] PU=0,0501
Г-6-фДГ, нмоль НАДФН/мин×мг белка	3,6 [2,1-4,2]	3,2 [2,3-4,1] PU=0,0478	3,0 [2,6-4,2] PU=0,0412	3,1 [2,4-4,1] PU=0,0433
ГГТ, нмоль/мин×мг белка	13,6 [11,3-14,6]	10,3 [8,6-12,7] PU=0,0442	10,1 [8,7-11,5] PU=0,0381	8,8 [7,4-10,6] PU=0,021

Более выражено, чем ГТ при действии тяжелых металлов и других токсичных элементов, содержащихся в руде, снижается активность гамма-глутамилтранспептидазы – ключевого фермента γ-глутамилового цикла, участвующего в механизмах переноса аминокислот через клеточные мембраны путем взаимодействия глутатиона с поступающей в клетку нейтральной аминокислотой.

Длительное поступление элементов, содержащихся в руде, приводит к накоплению в костной ткани ряда металлов (Cu, Zn, Sr, Mn, Fe, Cd, Pb, Hg и др.) [22, 76], усилению свободно-радикального окисления и процессов резорбции. Снижение уровней восстановленного глутатиона, свободных тиоловых групп белков, активности глутатионзависимых ферментов демонстрирует истощение

физиологических резервов системы глутатиона на фоне накопления металлов. Вместе с тем, снижение уровня ГВ в условиях интоксикации элементами руды может быть следствием нарушения ферментных систем его регенерации. Активность глутатион редуктазы (ГР), катализирующей непосредственно восстановление окисленной формы трипептида в первые месяцы наблюдения у подопытных животных снижается незначительно, статистически значимо не отличаясь от показателей контрольной группы, активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы – ключевого фермента гексозомонофосфатного пути окисления глюкозы, являющегося основным циклом обеспечения, восстановленным НАДФН в цитозоле снижена. Низкая активность Г-6-фДГ может лимитировать интенсивность регенерации окисленной формы глутатиона в восстановленный, что приводит к снижению буферной емкости тиоловых соединений в костной ткани.

Основным антиоксидантом цитозоля клеток помимо восстановленных тиолов является аскорбиновая кислота, эффективным перехватчиком гидроксильного, пероксидных и алкоксильных радикалов в липидном бислое биологических мембран – α -токоферол. Более того наличие аскорбиновой кислоты необходимо для регенерации α -токоферола, а окисленная форма витамина С – дегидроксиаскорбатный радикал редуцируется за счет восстановленного глутатиона. Изучение содержания α -токоферола и аскорбиновой кислоты в костной ткани при интоксикации, элементами медно-цинковой колчеданной руды выявило их снижение (Таблица 6).

Таблица 6 – Уровень антиоксидантных витаминов в костной ткани крыс при действии элементов медно-цинковой колчеданной руды, Ме [Q₁-Q₃]

Витамины	Группа животных			
	Контрольная, n=8	Опытная		
		Через 1 месяц, n=10	Через 2 месяца, n=10	Через 3 месяца, n=8
Аскорбиновая кислота, мкг/мг белка	2,15 [1,81-2,58]	2,21 [1,96-2,45] PU=0,3184	2,04 [1,82-2,06] PU PU=0,3004	1,58 [1,36-1,89] PU=0,0569
α -токоферол, нг/мг белка	12,4 [10,8-13,8]	11,6 [10,2-11,8] PU PU=0,4082	11,5 [10,6-12,3] PU PU=0,3529	10,2 [9,9-10,8] PU=0,0281

Содержание аскорбиновой кислоты через месяц после начала введения порошка руды в костной ткани даже несколько увеличивается, а в последующие сроки наблюдения происходит его снижение, которое, однако, не достигает статистической значимости. Уровень α -токоферола также не отличается от показателя контрольной группы животных в первые 2 месяца воздействия элементов руды и статистически значимо снижается к концу третьего месяца интоксикации. Такая динамика изменений уровня аскорбиновой кислоты при интоксикации тяжелыми металлами и другими токсичными элементами, содержащимися в руде цветных металлов, в отличие от характера изменений содержания восстановленного глутатиона, вероятно, связано не только с тем, что большая группа металлов связывается со свободными сульфгидрильными группами глутатиона, белков и пептидов [71], но и с синтезом аскорбиновой кислоты в глюкуронат-ксилолозном цикле, который функционирует в тканях крыс в отличие от тканей человека [78, 93].

Стабильность и активность основных ферментов антиоксидантной защиты в тканях взаимосвязаны. Глутатионпероксидаза, каталаза и супероксиддисмутаза могут инактивироваться одним из продуктов своей ферментативной реакции. Так, каталаза и глутатионпероксидаза защищают СОД от инактивации, метаболизируя пероксид водорода, а СОД при этом предохраняет каталазу и глутатионпероксидазу от инактивирующего действия супероксиданионрадикала [28]. Гидроксильный радикал, гипогалоиды, 4-гидрокси-2-ноненал и некоторые другие продукты липопероксидации также являются потенциальными ингибиторами глутатионпероксидазы [47, 131, 177]. Согласованное действие СОД, ГПО и каталазы является необходимым условием эффективной антиоксидантной защиты [28]. В этой связи были изучены активность СОД, каталазы и общей антиокислительной активности костной ткани (Таблица 7).

Активность СОД в течение первого месяца эксперимента не отличается от контроля и статистически значимо снижается лишь на 2 и 3 месяцы опыта. Активность каталазы уменьшается в большей степени.

Общая антиокислительная активность костной ткани, которая, по данным авторов разработки метода [52], в основном характеризует неферментативное

звено антиоксидантной защиты снижается в динамике интоксикации постепенно, но неуклонно, достигая статистической значимости к 3-му месяцу эксперимента.

Таблица 7 – Активность супероксиддисмутазы, каталазы и общая антиокислительная активность костной ткани крыс при воздействии компонентов медно-цинковой колчеданной руды, Me [Q₁-Q₃]

Показатели	Группа животных			
	Контрольная, n=10	Опытная		
		Через 1 ме- сяц, n=8	Через 2 меся- ца, n= 8	Через 3 месяца. n=8
СОД, Ед/мг белка	11,5 [9,1-12,4]	11,3 [9,2-12,6] PU=0,7041	9,1 [7,4-10,6] PU=0,012	8,3 [7,2-9,0] PU=0,0053
Каталаза, мкмоль/мин×мг белка	11,2 [9,3-12,9]	7,9 [6,5-9,2] PU=0,0382	6,6 [4,0-8,4] PU=0,0033	8,8 [6,6-11,2] PU=0,0501
ОАА, % ингибирования	21,4 [17,5-24,1]	20,4 [18,3-25,8] PU=0,5163	18,9 [17,2-20,8] PU=0,648	15,3 [12,9-17,7] PU=0,0047

Уровень глутатиона в большинстве тканей поддерживается путем поступления его из крови, а основным органом, обеспечивающим содержание глутатиона в плазме крови, является печень. Состояние печени оказывает существенное влияние на обмен кальция, метаболизм костной ткани, играет важную роль в процессах детоксикации большой группы металлов. Вполне вероятно, что избыточное поступление в организм меди, цинка, мышьяка, железа, кадмия, ртути, свинца и других элементов, содержащихся в медно-цинковых колчеданных рудах будет оказывать негативное влияние на функциональное состояние печени.

3.4 Глутатионовая система печени при интоксикации элементами медно-цинковой колчеданной руды

В печени синтезируется большая часть глутатиона (около 90%) и далее транспортируется в другие органы и ткани [58]. В печени можно выделить наличие двух пулов глутатиона – лабильного и стабильного [11, 38, 181], и при инги-

биривании синтеза глутатиона в печени содержание глутатиона в плазме крови снижается.

Определение содержания ГВ и ССГ в плазме крови крыс опытной группы действительно выявило их снижение (Таблица 8).

Таблица 8 – Содержание восстановленного глутатиона и свободных сульфгидрильных групп белков в плазме крови крыс при действии элементов медно-цинковой колчеданной руды, Ме [Q₁-Q₃]

Показатели	Группа животных			
	Контрольная, n=12	Через 1 месяц, n=10	Через 2 месяца, n=10	Через 3 месяца, n=8
ГВ, мкмоль/мг белка	20,8 [18,4-22,0]	18,9 [17,4-21,6] PU=0,2163	18,4 [16,5-20,8] PU=0,1756	15,3 [14,4-17,5] PU=0,0318
ССГ, мкмоль/мг белка	35,6 [33,7-37,7]	32,4 [30,2-35,8] PU=0,2412	32,6 [30,5-34,4] PU=0,2011	30,4 [30,1-34,2] PU=0,0362

Результаты изучения системы глутатиона печени у животных опытной группы (Таблица 9) показывают, что под влиянием компонентов медно-цинковой колчеданной руды происходит снижение уровня восстановленного глутатиона и ферментов, связанных с его содержанием и восстановлением.

К концу первого месяца затравки порошком руды наблюдается незначительное снижение уровня восстановленного глутатиона, который к третьему месяцу достигает статистической значимости. Одновременно выявляется и уменьшение содержания свободных тиоловых групп белков печени. На этом фоне обнаруживается падение активности глутатионзависимых ферментов – глутатионпероксидазы (ГПО), глутатион-S-трансферазы (ГТ) и гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТ).

В печени опытной группы крыс снижается активность ферментов, необходимых для восстановления в клетке окисленного глутатиона. Особенно страдает активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, являющейся ключевым ферментом пентозофосфатного цикла, активно осуществляющего в цитоплазме клеток вос-

становление НАДФН, необходимого для функционирования глутатионредуктазы. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы снижается почти наполовину по сравнению с группой контрольных животных.

Таблица 9 – Влияние введения элементов, содержащихся в медно-цинковой колчеданной руде на показатели метаболизма глутатиона в печени, Ме [Q₁-Q₃]

Показатели	Группа животных			
	Контрольная, n=12	Через 1 месяц, n=10	Через 2 месяца, n=10	Через 3 месяца, n=8
ГВ, мкмоль/мг белка	10,75 [7,79 – 12,18]	9,25 [8,10 – 13,15] PU=0,1445	7,80 [6,05 – 11,16] PU =0,0404	7,3 [5,71 – 9,14] PU =0,0409
ССГ, мкмоль/мг белка	16,5 [13,4 – 19,3]	15,6 [12,8 – 17,6] PU=0,05822	14,1 [12,6 – 15,3] PU =0,1605	11,8 [10,9 – 14,6] PU =0,0378
ГПО, нмоль/мин×мг белка	7,92 [6,64 – 9,74]	6,85 [6,15 – 8,40] PU =0,0482	5,55 [4,41 – 5,93] PU =0,0262	5,35 [4,33 – 5,75] PU =0,0178
ГТ, мкмоль/мин×мг белка	146,0 [136,2 – 153,4]	136,5 [126,4 – 147,2] PU =0,0934	130,1 [119,3 – 147,0] PU =0,0826	109,3 [104,6 – 121,1] PU =0,0243
ГР, нмоль/мин×мг белка	110,5 [92,6 – 121,3]	94,8 [81,6 – 98,2] PU =0,0724	90,3 [75,4 – 101,4] PU =0,0406	82,4 [76,3 – 91,8] PU =0,0226
Г-6-ф ДГ, мкмоль НАДФН/мин×мг белка	0,79 [0,66 – 0,88]	0,66 [0,60 – 0,82] PU =0,0411	0,54 [0,45 – 0,59] PU =0,0323	0,42 [0,38 – 0,51] PU =0,024
ГГТ, мкмоль/мг белка	3,66 [3,01 – 4,82]	3,11 [2,76 – 3,58] PU =0,0422	2,86 [2,41 – 3,11] PU =0,0366	2,48 [2,11 – 3,56] PU =0,0113

При действии тяжелых металлов и других токсичных элементов, содержащихся в руде цветных металлов, в печени животных нарушается уровень и других компонентов антиоксидантной защиты, тесно связанных с системой глутатиона (Таблица 10). Снижается содержание аскорбиновой кислоты и α -токоферола, а также общая антиокислительная активность ткани, в основном отражающая неферментативное звено антиоксидантной защиты.

Обращает внимание факт снижения в печени опытной группы животных содержания аскорбиновой кислоты, которая у крыс синтезируется из L-гулоновой

кислоты, образуемой при окислении глюкуроновой кислоты в глюкуронат-ксилоулозном цикле. При этом биосинтез гулоновой кислоты, катализируемой L-гулонат: НАДФ-оксидоредуктазой (КФ 1.1.1.19) требует восстановленной формы НАДФН [93] и, следовательно, конкурирует с процессом восстановления окисленного глутатиона.

Таблица 10 – Содержание некоторых показателей антиоксидантной защиты печени крыс при длительной интоксикации элементами медно-цинковой колчеданной руды, Ме [Q₁-Q₃]

Показатели	Группа животных			
	Контрольные, n=10	Через 1 месяц, n=10	Через 2 месяца, n=10	Через 3 месяца, n=8
Аскорбат, мкг/мг белка	12,4 [10,9-13,8]	12,7 [10,2-13,7] PU = 0,7082	11,5 [10,6-12,3] PU = 0,3599	10,2 [9,9-11,8] PU = 0,0281
α – токоферол, мкг/мг белка	5,69 [4,95-6,36]	4,91 [4,44-5,62] PU = 0,0343	4,90 [4,26-5,72] PU = 0,0365	5,03 [4,21-5,37] PU = 0,0378
СОД, Ед/мг белка	10,2 [7,2-11,4]	8,4 [7,6-10,5] PU = 0,0435	7,4 [6,3-8,8] PU = 0,0311	7,6 [6,4-8,2] PU = 0,0366
Каталаза, мкмоль/мин×мг белка	8,3 [7,5-8,9]	7,5 [6,3-8,7] PU = 0,1532	7,9 [5,7-8,8] PU = 0,6161	6,7 [5,4-7,8] PU = 0,092
ОАА, %	41,1 [36,2-48,4]	37,4 [30,8-40,6] PU = 0,7341	35,5 [30,1-41,9] PU = 0,0426	34,2 [26,5-38,3] PU = 0,0342

В ткани печени опытной группы животных во все сроки исследования статистически значимо снижена активность супероксиддисмутазы, а активность каталазы достоверно падает лишь к третьему месяцу интоксикации.

На фоне постепенного снижения уровня, восстановленного глутатиона, аскорбиновой кислоты, α -токоферола и активности основных антиоксидантных ферментов у животных наблюдались нарушения функционального состояния печени. У крыс опытной группы в плазме крови выявились достоверные изменения содержания альбумина, билирубина, холестерина, активности аланиновой и аспарагиновой трансаминаз, щелочной фосфатазы (Таблица 11), в то время как падение уровня общего белка не достигло статистической значимости.

Таблица 11 – Показатели функционального состояния печени у крыс при действии компонентов медно-цинковой колчеданной руды, $\bar{X} \pm s_x$.

Показатели	Группа животных			
	Контрольная, n=10	Через 1 месяц, n=10	Через 2 месяца, n=10	Через 3 месяца, n=12
Белок, г/л	71,2 $\pm$ 2,35	70,6 $\pm$ 3,30 P=0,5733	66,8 $\pm$ 3,16 P=0,1833	65,4 $\pm$ 2,46 P=0,0609
Альбумин, г/л	37,3 $\pm$ 2,14	35,1 $\pm$ 1,88 P=0,6704	30,4 $\pm$ 1,38 P=0,0408	29,8 $\pm$ 2,16 P=0,0432
Билирубин, мкмоль/л	10,9 $\pm$ 0,36	9,8 $\pm$ 0,44 P=0,0538	12,3 $\pm$ 0,49 P=0,0235	15,0 $\pm$ 0,53 P<0,0001
Холестерин, ммоль/л	3,18 $\pm$ 0,26	3,22 $\pm$ 0,248 P=0,6021	3,56 $\pm$ 0,293 P=0,0896	3,78 $\pm$ 0,241 P=0,0394
АСТ, Ед/л	30,8 $\pm$ 2,15	43,3 $\pm$ 2,83 P=0,0318	49,9 $\pm$ 2,74 P=0,0276	56,8 $\pm$ 4,07 P=0,0053
АЛТ, Ед/л	25,6 $\pm$ 2,03	41,2 $\pm$ 2,66 P=0,0028	44,0 $\pm$ 2,68 P=0,0023	60,2 $\pm$ 3,62 P=0,0008
ЩФ, Ед/л	104 $\pm$ 5,16	118 $\pm$ 5,66 P=0,0607	130 $\pm$ 4,93 P=0,0413	138 $\pm$ 4,11 P=0,0088

Выявленные изменения биохимических констант в плазме крови со всей очевидностью характеризуют, изменения функционального состояния печени. Повышение активности аланиновой и аспарагиновой трансаминаз отражает развитие цитолитического синдрома и свидетельствует о повышении проницаемости плазматических и, возможно, митохондриальных мембран гепатоцитов. На это указывает и постепенное снижение коэффициента де Ритиса – соотношение активностей АСТ/АЛТ с 1,21 $\pm$ 0,12 у животных контрольной группы до 0,94 $\pm$ 0,13 (P=0,0214) к завершению третьего месяца эксперимента у крыс опытной группы. Повышение активности в крови щелочной фосфатазы может быть следствием нарушений не только гепато-билиарной системы, но и изменений состояния костной ткани, однако исследования активности костного изофермента щелочной фосфатазы не выявили столь существенных изменений у крыс опытной групп. По всей вероятности, более высокие активности щелочной фосфатазы, содержание в крови билирубина и холестерина можно интерпретировать, как нарушения экскреторной функции печени.

Таким образом, при интоксикации элементами, содержащимися в медно-цинковой руде и в печени животных наблюдается повреждение системы глутати-

она, снижение уровня основных антиоксидантных витаминов-аскорбата и α -токоферола, активности ключевых ферментов антиоксидантной защиты, а также негативные изменения функционального состояния органа.

3.5 Влияние элементов медно-цинковой колчеданной руды на гистологическую структуру костной ткани крыс

Для решения данной задачи изучалась структура эпифиза и диафиза бедренной кости самцов крыс контрольной группы и опытной группы через 1, 2 и 3 месяца от начала ежедневного введения суспензии порошка руды. У животных контрольной группы во все сроки исследования структура бедренной кости не подвергалась изменениям. Наружная и внутренняя поверхности кортикальной кости бедра покрыты слоями клеток соединительной ткани – надкостницей и эндостом. Наружный слой надкостницы, толщина которой колеблется примерно от 60 мкм в средней части до 300 мкм к концам бедренной кости, включает наружный слой, представленный коллагеновыми волокнами и фибробластами, и внутренний слой, содержащий значительное количество клеток, в том числе фибробластоподобные остеопрогениторные клетки (Рисунок 4).

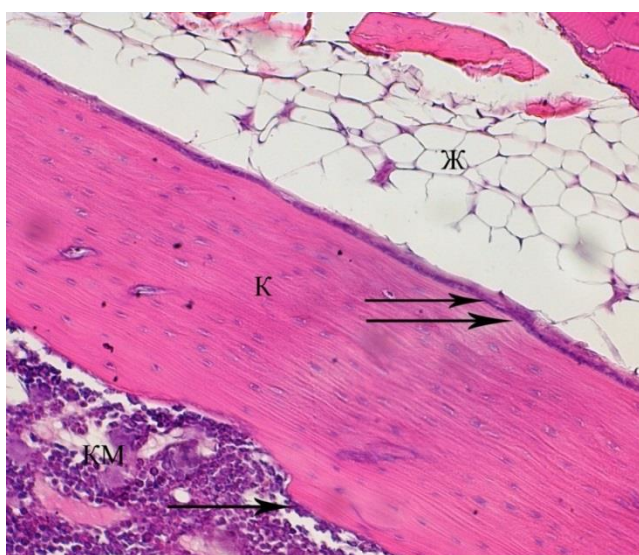


Рисунок 4 – Структура бедренной кости крысы контрольной группы

К – стенка трубчатой кости; КМ – костный мозг; Ж – жировая ткань; М – мышечная ткань; эндост – указан стрелкой (↑); периост – указан двумя стрелками (↑↑). Окраска гематоксилином и эозином.

Увел. x100

Компактная кость кортикальной части бедра имеет развитую сеть разнонаправленных гаверсовых каналов различного калибра и остеоцитарными лакунами с остеоцитами. Остеоциты располагаются между наружными и внутренними обшивками пластинками, имеют чаще всего звёздчатую форму из-за множества отростков, тянущихся в костных канальцах (Рисунок 5).

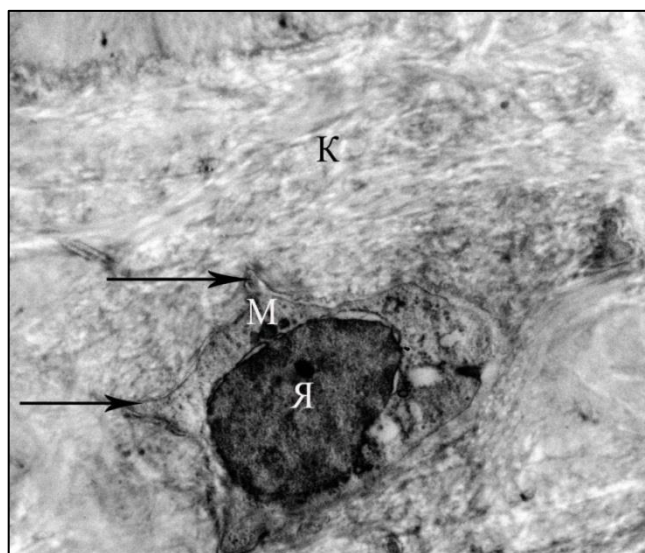


Рисунок 5 – Ультраструктура бедренной кости крысы контрольной группы

К – костная ткань; Я – ядро остеocyта; каналы гранулярного эндоплазматического ретикулума – указаны стрелкой (↑); М – митохондрии. Электронная микрофотография. Увел.х6000

Значительный объем клетки занимает овальное ядро, кроме того определяются небольшое количество полисом, коротких каналов эндоплазматического ретикулума и единичные мелкие округлые или овальные митохондрии. В гаверсовых каналах определяются кровеносные сосуды. Они вместе с окружающими костными пластинками формируют остеон. Остеоны между собой соединены вставочными пластинками.

Эндост выстилает все внутренние полости кости и состоит из одного слоя уплощенных вытянутых клеток – остеобластов (Рисунок 6). Электронно-микроскопически в светлой цитоплазме остеобластических клеток выявляется большое количество коротких цистерн гранулярного эндоплазматического ретикулума – аппарата синтеза белка.

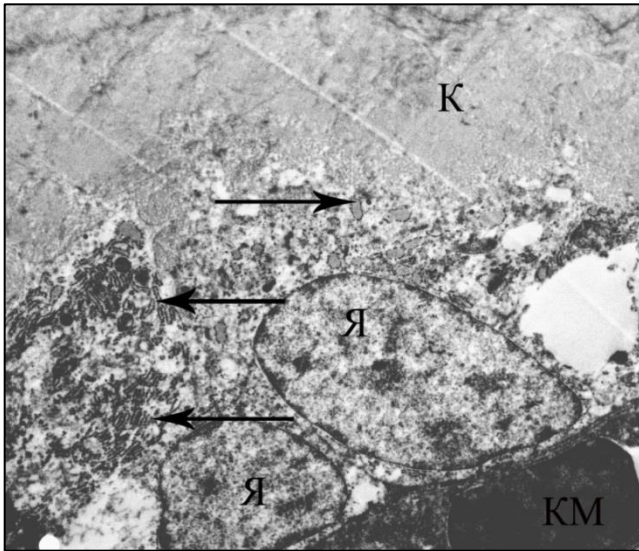


Рисунок 6 – Ультраструктура бедренной кости крысы контрольной группы

К – костная ткань; КМ – костный мозг; Я – ядро остеобласта; каналы гранулярного эндоплазматического ретикулума – указаны стрелкой (↑). Электронная микрофотография. Увел.х6000

При окраске по Ван-Гизону костная ткань окрашивается в ярко-красный цвет (фуксинофилия), что свидетельствует о хорошей сохранности структуры коллагеновых волокон (Рисунок 7).

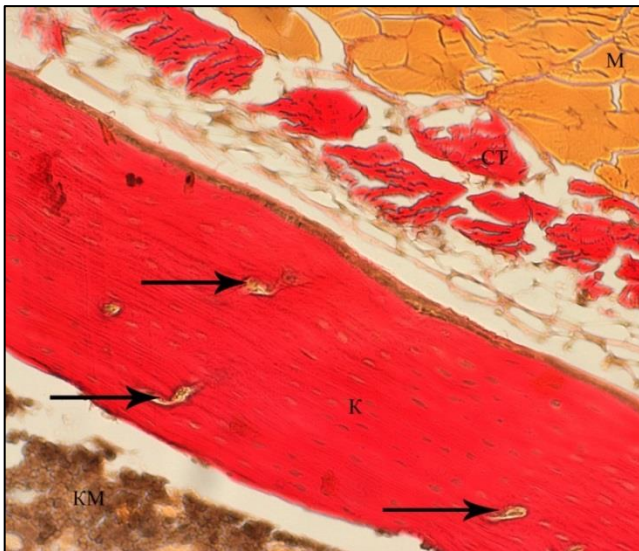


Рисунок 7 – Структура бедренной кости крысы контрольной группы

К – костная ткань; КМ – костный мозг; Ж – жировая ткань; СТ – соединительная ткань; Гаверсовы каналы с сосудами (↑). Окраска по Ван-Гизону. Увел.х100

Эпифиз образован губчатой костью и эпифизарной хрящевой пластинкой (Рисунок 8). Эпифизарный хрящ разделяется на пять зон: снаружи – зона покоя, состоящая из гиалинового хряща, в клетках которого морфологические изменения отсутствуют. Затем внутрь идет зона пролиферации, которая характеризуется быстрым делением хондроцитов, формирующих колонки. Клетки в них лежат в виде стопок, параллельных длиной оси кости. Далее находится зона гипертрофи-

рованного хряща, которая состоит из крупных хондроцитов. Затем идет зона кальцификации хряща. Это участок, где наравне с гибелью хондроцитов происходит кальцификация тонких перекладин хрящевого матрикса за счет отложения гидроксиапатита. Зона окостенения – зона, где появляется энхондральная костная ткань (Рисунок 9).

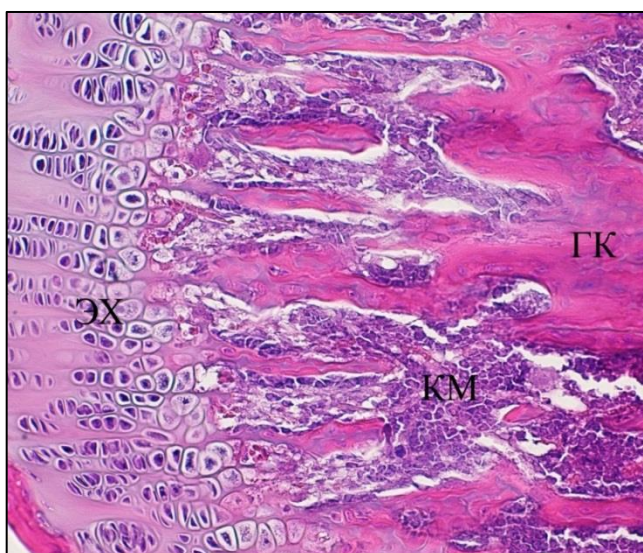


Рисунок 8 – Структура эпифиза бедренной кости крысы контрольной группы

ЭХ – эпифизарный хрящ; КМ – костный мозг; ГК – губчатая кость. Окраска гематоксилином и эозином. Увел.х200

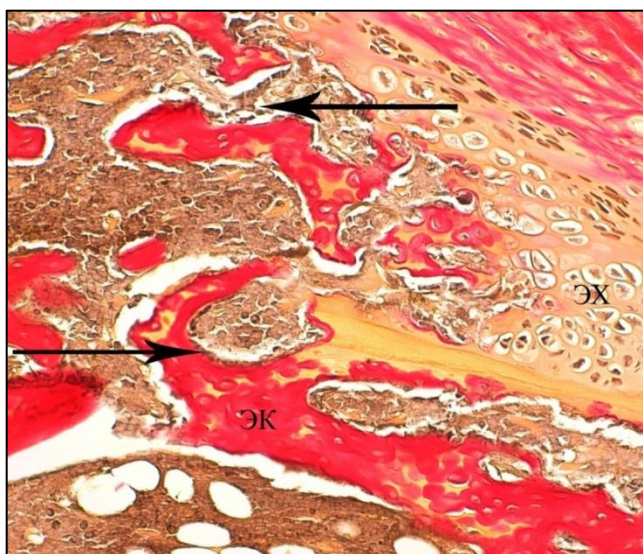


Рисунок 9 – Структура эпифиза бедренной кости крысы контрольной группы

ЭХ – эпифизарный хрящ; КМ – костный мозг; ЭК – эндохондральная новообразованная кость; остеобласты – указаны стрелкой (↑). Окраска по Ван-Гизону. Увел.х200

В полости, образованные погибшими хондроцитами, внедряются кровеносные капилляры и остеопрогениторные клетки (остеогенные предшественники) из надкостницы. Эти клетки дают начало остеобластам, которые распределяются в виде прерывистого слоя по поверхности балок, образованных минерализованным хрящевым матриксом. На его поверхности остеобласты откладывают слой пер-

вичной костной ткани, состоящей из неминерализованного костного матрикса – остеоида. Костные балки губчатого вещества имеют типичное строение. Сеть анастомозирующих трабекул образована параллельно лежащими костными пластинками. Пространство между трабекулами заполнено костным мозгом, поверхности дуг и арок трабекул губчатого вещества покрыты остеобластами.

У большинства животных, получавших суспензию порошка руды, через месяц после начала эксперимента морфологические изменения проявлялись не столь заметно, структура костной ткани бедра мало отличалась от контрольной группы. Выраженных патологических изменений не выявлялось (Рисунок 10).



Рисунок 10 – Структура диафиза бедренной кости крысы опытной группы через 1 месяц после начала эксперимента

К – костная ткань; КМ – костный мозг; М – мышечная ткань. Окраска гематоксилином и эозином. Увел.х40

Ровная надкостница в области диафиза была представлена не широким слоем коллагеновых волокон, фибробластическими клетками и слоем фибробласто-подобных остеопрогениторных клеток, лежащих непосредственно на кортикальной пластинке (Рисунок 11).

Однако у некоторых крыс в области диафиза под надкостницей определялись неглубокие резорбционные полости – узур, возникающие под действием активизирующихся остеокластов (Рисунок 12). В этих областях наружный слой коллагеновых волокон отслаивался от клеточной части надкостницы. Ультраструктура клеток эндоста была почти идентична таковой контрольной группы (Рисунок 13), однако количество характерных коротких канальцев гранулярного

эндоплазматического ретикулума в оптически светлой цитоплазме остеобластов выявлялось меньше, чем в контрольной группе.

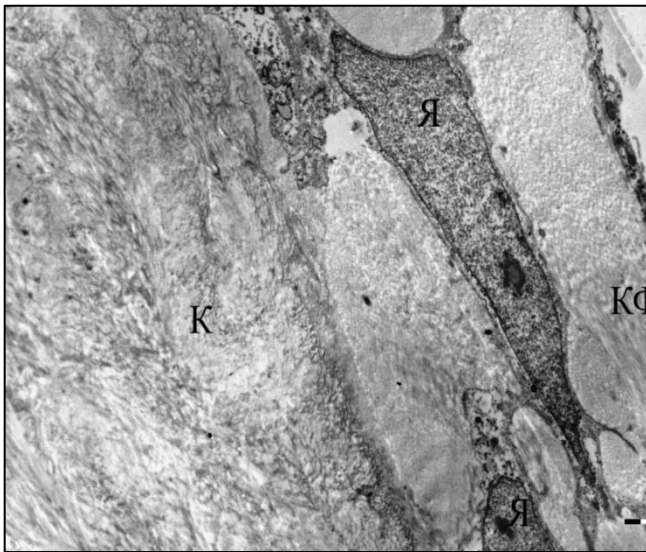


Рисунок 11 – Ультраструктура бедренной кости крысы контрольной группы опытной группы через 1 месяц после начала эксперимента

К – кортикальная пластинка; Я – ядро фибробластоподобной остеопрогениторной клетки; КФ – коллагеновые фибриллы. Электронная микрофотография

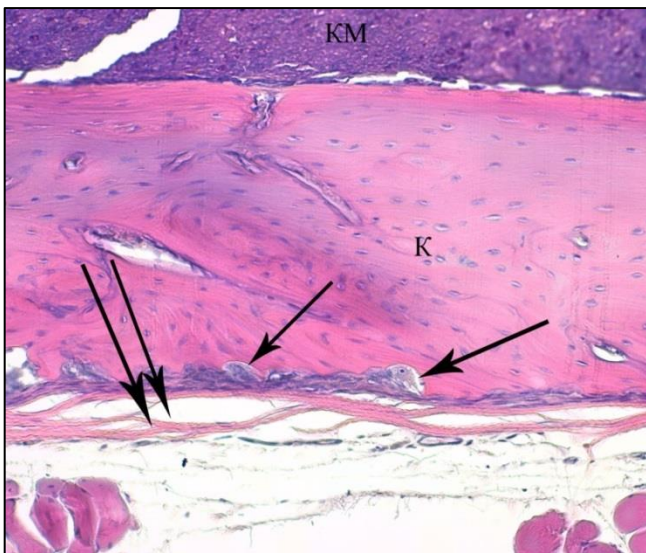


Рисунок 12 – Структура диафиза бедренной кости крысы опытной группы через 1 месяц после начала эксперимента

К – костная ткань; КМ – костный мозг; резорбционные узурры указаны стрелкой (↑); отслоившиеся коллагеновые волокна указаны двумя стрелками (↑↑). Окраска гематоксилином и эозином. Увел.х100

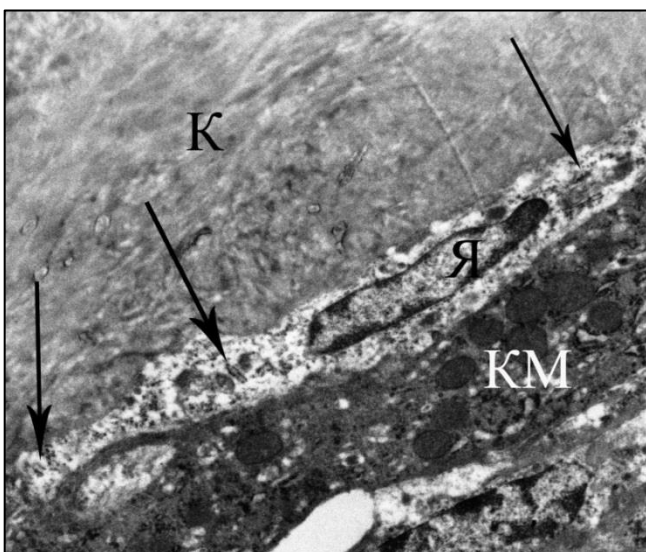


Рисунок 13 – Ультраструктура бедренной кости крысы опытной группы через 1 месяц после начала эксперимента

К – костная ткань; Я – ядро остеобластической клетки эндоста; КМ – клетки костного мозга; канальцы гранулярного эндоплазматического ретикулума в цитоплазме остеобласта указаны стрелкой (↑). Электронная микрофотография.

Увел.х8000

Через 1 месяц у крыс опытной группы в компактной кости хорошо просматривались гаверсовы каналы с мелкокалиберными кровеносными сосудами, а электронно-микроскопически – лакуны с находящимися в них остеоцитами, имеющими типичную структуру (Рисунок 14).

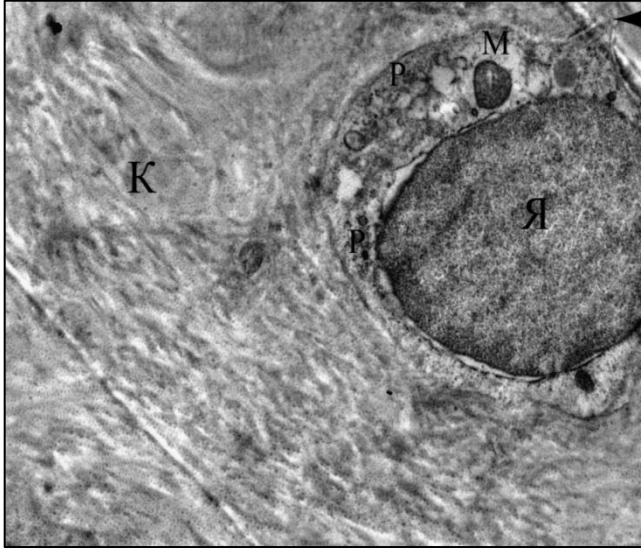


Рисунок 14 – Ультраструктура бедренной кости крысы опытной группы через 1 месяц после начала эксперимента

К – компактная костная ткань; Я – ядро остеокита; М – митохондрии; рибосомы и полисомы в цитоплазме остеобласта; отросток остеокита в канальцах указан стрелкой (↑). Электронная микрофотография. Увел.х8000

В эпифизарном хряще выявлялись типичные зоны: зона покоя из гиалинового хряща с неизмененными хрящевыми клетками, зона пролиферации с делящимися хондроцитами, несколько увеличенная зона гипертрофированного хряща из крупных хондроцитов и зона кальцификации хряща, где происходит кальцификация хрящевого матрикса за счет отложения гидроксиапатита. Далее определялась зона окостенения, где формируется энхондральная костная ткань. На поверхности новообразованных костных балок были хорошо видны длинные базофильно окрашивающиеся цепочки остеобластических клеток, синтезирующих неминерализованный костный матрикс – остеоид, бледно окрашивающийся эозином (Рисунок 15).

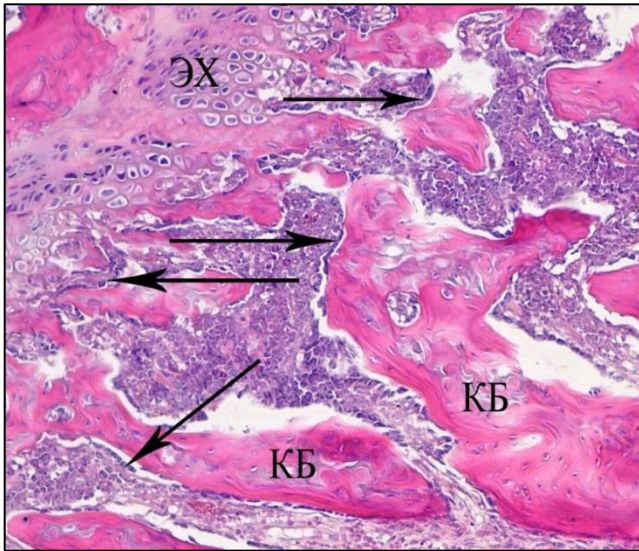


Рисунок 15 – Структура губчатой кости в области эпифиза бедренной кости крысы опытной группы через 1 месяц после начала эксперимента

ЭХ – эпифизарный хрящ; КБ – новообразованные костные балки; цепочки остеобластов указаны стрелкой (↑).

Окраска гематоксилином и эозином.

Увел.х100

В опытных группах крыс через 2 и 3 месяца патоморфологические изменения по признакам проявления были примерно одинаковые, но по степени через 3 месяца были более выраженными. Изменения заключались в проявлении деструктивных процессов эпифизарного хряща, губчатой кости и нарушения микроархитектоники костной ткани диафиза вследствие ее резорбции остеокластами.

Уже через 2 месяца вследствие усиления компенсаторно-восстановительных процессов, происходящих обычно после деструктивных процессов надкостница, особенно в области эпифиза, сильно утолщалась, причем как клеточная, так и волокнистая составляющие (Рисунок 16).

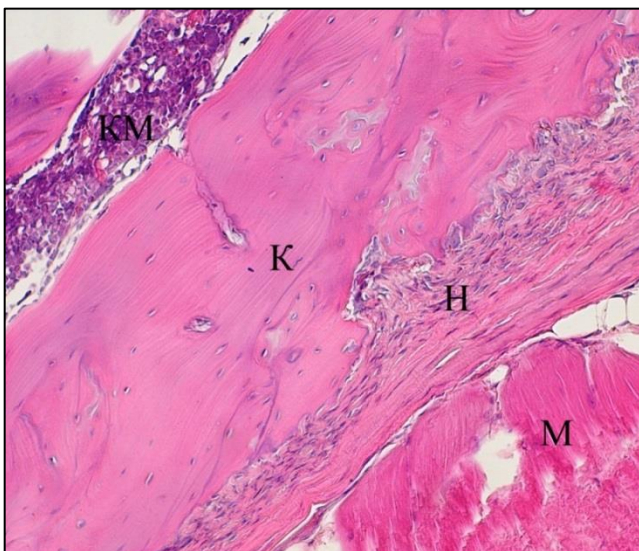


Рисунок 16 – Структура бедренной кости ближе к области эпифиза у крысы опытной группы через 2 месяца после начала эксперимента

К – костная ткань; Н – утолщенная надкостница; КМ – костный мозг; М – мышечная ткань. Окраска гематоксилином и эозином. Увел.х100.

В области диафиза внутри слоя надкостницы выявлялись очаговые и диффузные кровоизлияния, свидетельствующие о сосудистых нарушениях при интоксикации (Рисунок 17). Признаки сосудистого стаза в виде скопления эритроцитов в просвете сосуда определялись и в сосудах в гаверсовых каналах. В области диафиза под надкостницей определялось значительное количество узуров, в которых часто выявлялись многоядерные крупные остеокласты, подвергающие костную ткань лизису и резорбции (Рисунок 18).

В резорбционных лакунах разрасталась волокнистая бессосудистая соединительная ткань с фибробластическими клетками. Поверхность кортикальной пластинки под надкостницей из-за появившихся узуров становилась очень извилистой и даже как бы изрезанной (Рисунок 19).

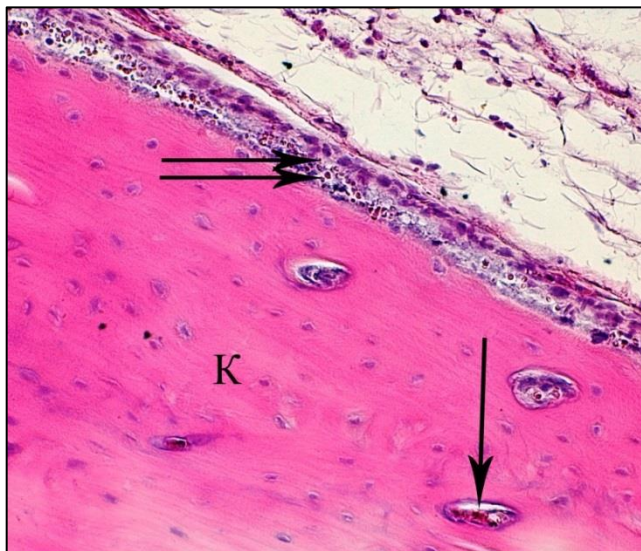


Рисунок 17 – Структура бедренной кости в области диафиза у крысы опытной группы через 2 месяца после начала эксперимента

К – костная ткань; сосудистый стаз в гаверсовом канале – указано стрелкой (↑); диффузные кровоизлияния в надкостнице – указаны двумя стрелками (↑↑). Окраска гематоксилином и эозином. Увел.х200

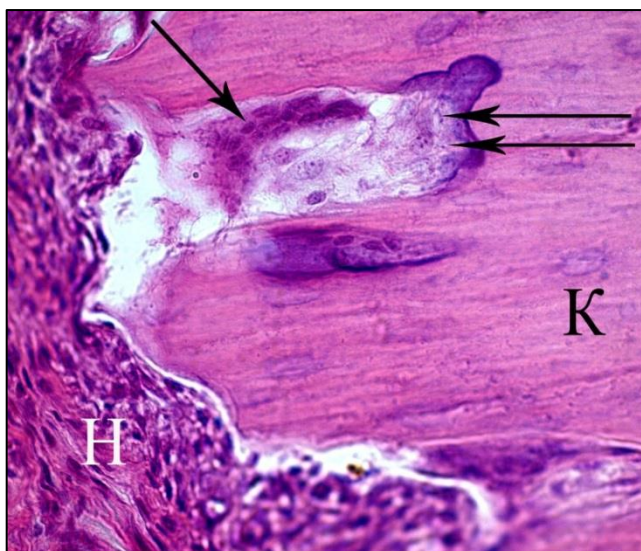


Рисунок 18 – Структура бедренной кости крысы опытной группы через 2 месяца после начала эксперимента

К – костная ткань; Н – надкостница; многоядерный остеокласт – указано стрелкой (↑); формирующиеся резорбционные узуровы – указаны двумя стрелками (↑↑). Окраска гематоксилином и эозином. Увел.х400

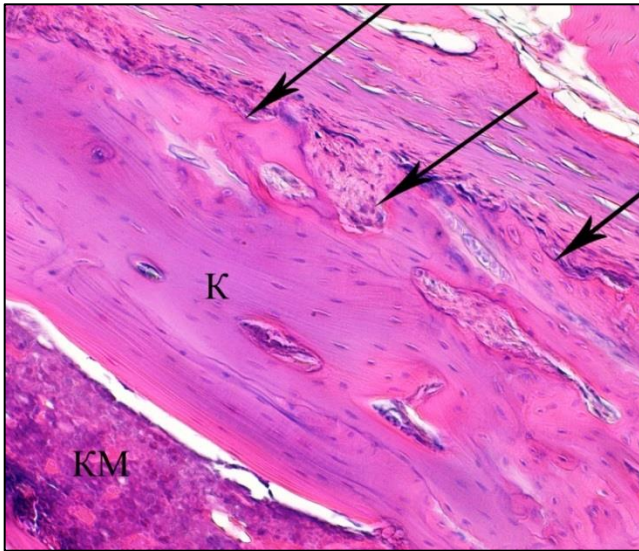


Рисунок 19 – Структура бедренной кости в области диафиза у крысы опытной группы через 2 месяца после начала эксперимента

К – костная ткань; КМ – костный мозг; резорбционные узурры – указаны стрелкой (↑). Окраска гематоксилином и эозином. Увел.х100

На электронно-микроскопическом уровне остеобласты эндоста определялись как активные с увеличенным количеством канальцев гранулярного эндоплазматического ретикулума в цитоплазме (как признак компенсаторно-восстановительных процессов), так и «истощенные» с дистрофическими изменениями в виде набухания цитозоля и вакуолизации цитоплазмы, вследствие чего клетки из удлиненных превращались в округлые большие (Рисунок 20). В лакунах покоящиеся остециты также имели патологические изменения в виде набухания и вакуолизации цитоплазмы (Рисунок 21). Они увеличивались в размерах. Костная ткань вокруг лакун часто была несколько гомогенизированной. Отдельные остециты, наоборот, подвергались сморщиванию и уменьшались в размерах (Рисунок 22). Лакуны и канальца в костной ткани опустевали. Отростки остеocyта теряли связь с другими клетками. Ядра становились плотными, темными. Костная ткань вокруг таких лакун тоже выглядела гомогенной, микроструктура ткани нарушалась.

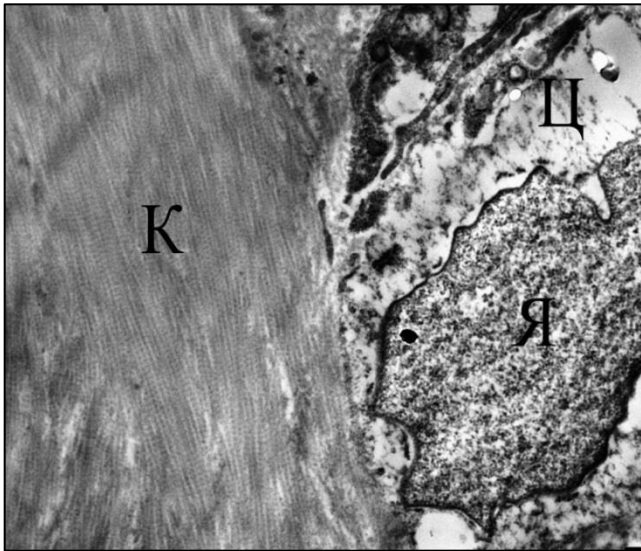


Рисунок 20 – Ультраструктура бедренной кости в области эндоста у крысы опытной группы через 2 месяца после начала эксперимента

К – компактная костная ткань; Я – ядро остеобласта; Ц – цитоплазма; В – вакуоли в цитоплазме. Электронная микрофотография. Увел.х8000

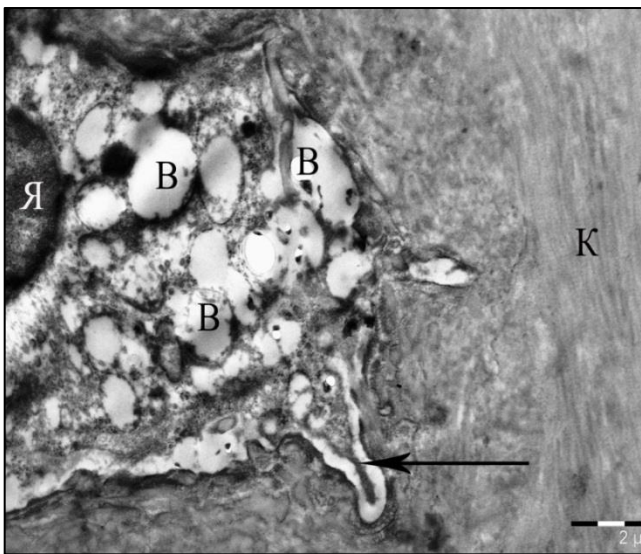


Рисунок 21 – Ультраструктура бедренной кости в области диафиза у крысы опытной группы через 2 месяца после начала эксперимента

К – компактная костная ткань; Я – ядро остеocyта; В – вакуоли в цитоплазме; отросток остеocyта в канальце указан стрелкой (↑). Электронная микрофотография

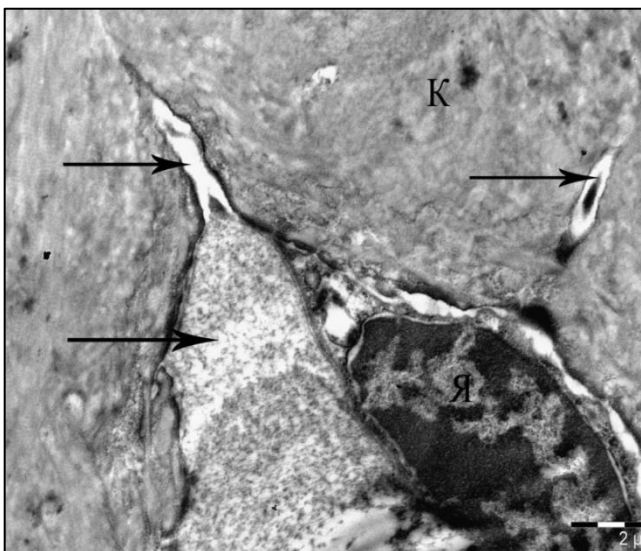


Рисунок 22 – Ультраструктура бедренной кости в области диафиза у крысы опытной группы через 2 месяца после начала эксперимента

К – компактная костная ткань; Я – ядро сморщенного остеocyта; пустые канальцы и пустота в лакуне указаны стрелкой (↑). Электронная микрофотография

В эпифизах бедренных костей также выявлялись начальные признаки разрушения суставных хрящей. Характерные для нормы зоны покоя, пролиферации и

гипертрофированного хряща не имели четких границ между собой, хотя количество последнего явно увеличивалось, вероятно, тоже как усиление компенсаторно-восстановительных процессов (Рисунок 23). Костные трабекулы были разной толщины, часто укороченными и с неровными краями, вследствие резорбтивных процессов.

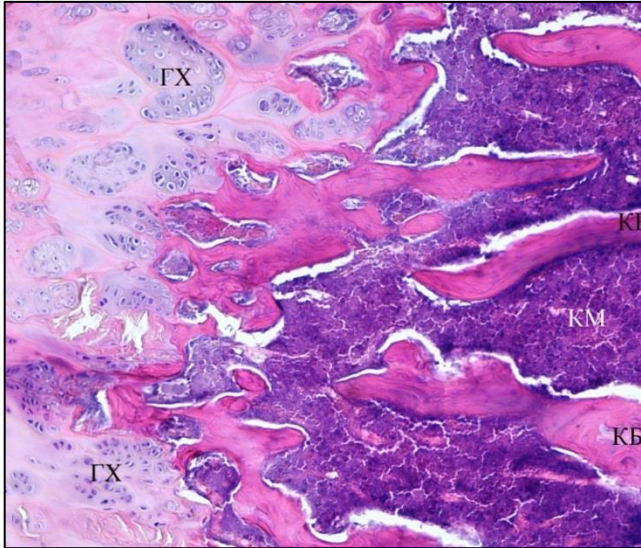


Рисунок 23 – Структура бедренной кости в области эпифиза у крысы опытной группы через 2 месяца после начала эксперимента
ГХ – гипертрофированный хрящ; КБ – костные балки губчатой кости; КМ – костный мозг. Окраска гематоксилином и эозином. Увел.х100

Через 3 месяца после начала ежедневного введения суспензии порошка медно-цинковой колчеданной руды у экспериментальных животных на гистологических препаратах бедренной кости выявлялись признаки заметного истончения костной ткани в области диафиза вследствие разрушения и резорбции костного матрикса. Из-за наличия резорбционных полостей трубчатые кости имели неровные края как со стороны эндоста, так и со стороны периоста (Рисунок 24). Многочисленные довольно глубокие узурь определялись по всей длине диафиза. В них со стороны надкостницы вращала рыхлая соединительная ткань с многочисленными остеокластами.

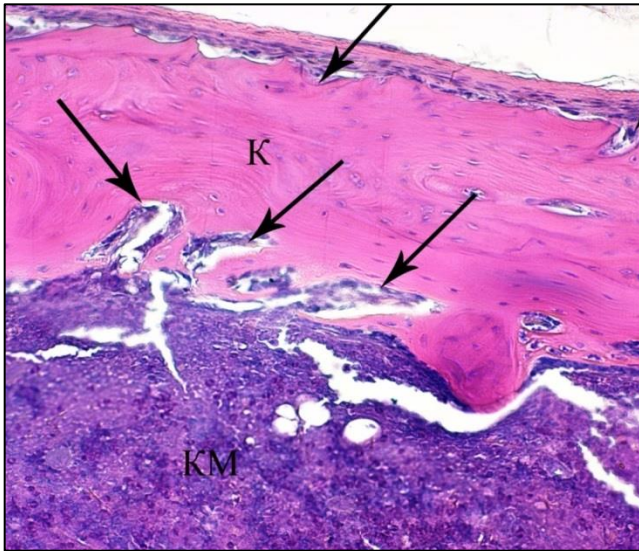


Рисунок 24 – Структура бедренной кости в области диафиза у крысы опытной группы через 3 месяца после начала эксперимента
К – костная ткань; КМ – костный мозг; резорбционные лакуны (узуры) указаны стрелкой (↑). Окраска гематоксилином и эозином. Увел. x100

На электронно-микроскопическом уровне в разрушающейся костной ткани в цитоплазме покоящихся остеоцитов в костных лакунах обнаруживались выраженные признаки деструкции всех внутриклеточных органелл. Вместо них появлялись большие светлые вакуоли, которые оттесняли ядро на периферию или сжимали ядро, сильно деформируя его (Рисунок 25).

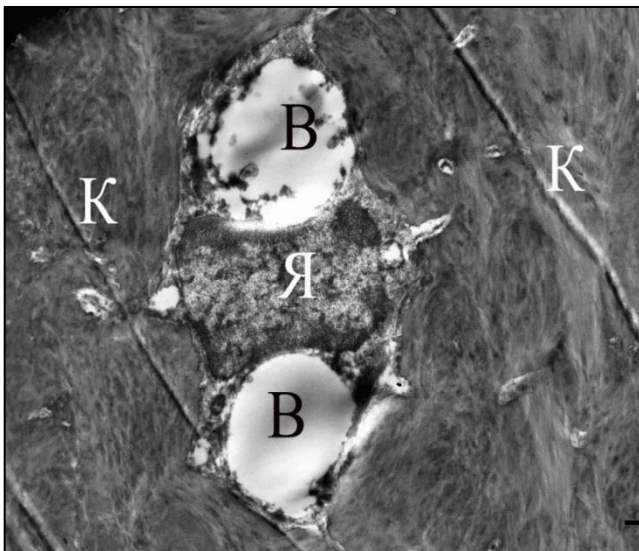


Рисунок 25 – Ультраструктура бедренной кости в области диафиза у крысы опытной группы через 3 месяца после начала эксперимента
К – компактная костная ткань; Я – деформированное ядро остеocyта; В – вакуоли в цитоплазме. Электронная микрофотография

Во многих лакунах костной ткани обнаруживались только фрагменты разрушенных остеоцитов (Рисунок 26).

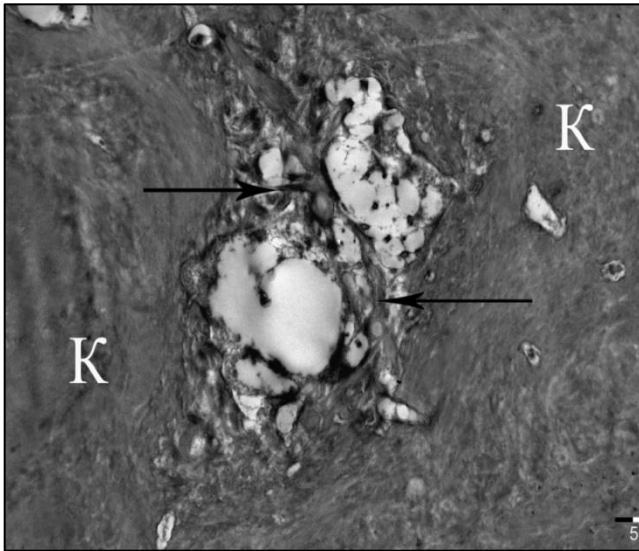


Рисунок 26 – Ультраструктура бедренной кости в области диафиза у крысы опытной группы через 3 месяца после начала эксперимента К – компактная костная ткань; фрагменты разрушенного остеокита в лакуне указаны стрелкой (↑). Электронная микрофотография

В некоторых участках компактной ткани диафиза бедренной кости крыс опытной группы через 3 месяца эксперимента, также как одно из проявлений компенсаторно-восстановительного процесса при разрушении костной ткани, определялись зоны костеобразования – процесса остеогенеза (Рисунок 27).

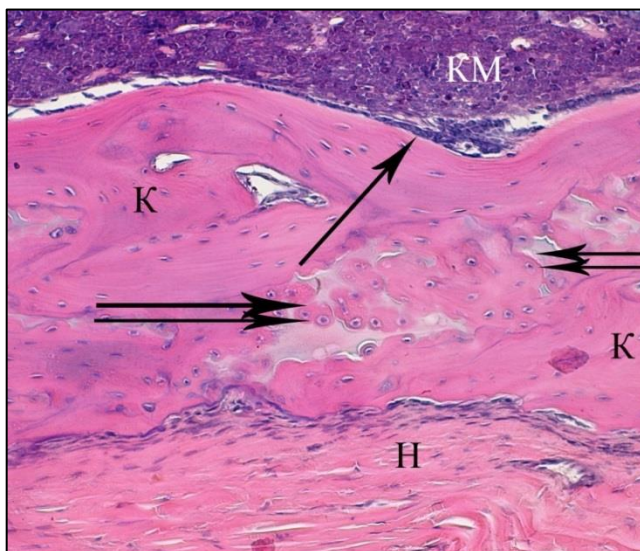


Рисунок 27 – Структура бедренной кости в области диафиза у крысы опытной группы через 3 месяца после начала эксперимента К – костная ткань; КМ – костный мозг; Н – утолщенная надкостница; эндост указан стрелкой (↑); новообразование кости – указано двумя стрелками (↑↑). Окраска гематоксилином и эозином. Увел.х100

Такие зоны чаще обнаруживались в участках истончения стенок трубчатой кости, иногда вытягиваясь на значительные расстояния в сторону эпифизов. Вероятно, в процессе остеогенеза участвовали остеобластические клетки и эндоста, и периоста, так как клеточные слои данных структур утолщались. Остеобластические клетки выявились иногда в 2-3 ряда. Ультраструктурно у активных остеобла-

стов в цитоплазме определялось множество коротких канальцев гранулярного эндоплазматического ретикулума (Рисунок 28).

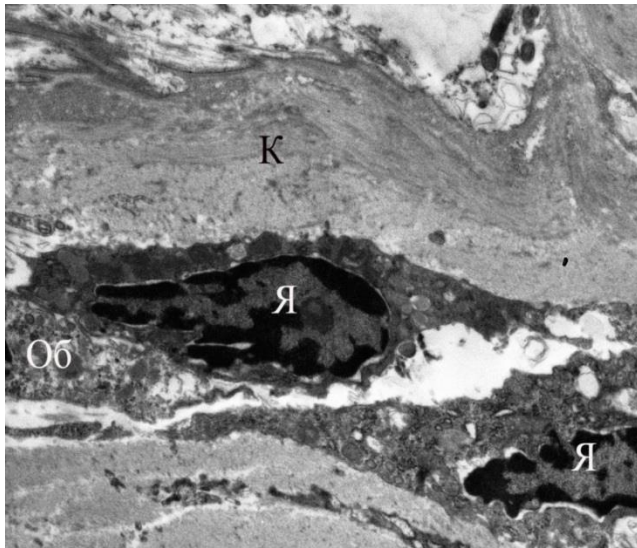


Рисунок 28 – Ультраструктура надкостницы бедренной кости в области диафиза у крысы опытной группы через 3 месяца после начала эксперимента

К – компактная костная ткань; Я – ядро остеобласта; Об – остеобласт. Электронная микрофотография. Увел.х5000

В эпифизах бедренной кости признаки разрушения суставных хрящей нарастали. Суставной хрящ истончался. Характерные для нормы зоны покоя, пролиферации хрящевых клеток, гипертрофированного хряща и зона кальцификации хряща четко не разделялись и, непосредственно, как зоны не дифференцировались, хотя зона окостенения продолжала просматриваться (Рисунок 29). Но со стороны утолщенной надкостницы активизировались остеокласты, которые подвергали резорбции зону окостенения (Рисунок 30). Формирующиеся в этих областях многочисленные резорбционные полости были довольно глубокими. В них определялась плотная бессосудистая волокнистая соединительная ткань с большим количеством фибробластических клеток, и, как видно на рисунке, почти во всех узлах хорошо просматривались многоядерные остеокласты. Резорбционным процессам подвергались и костные балки губчатой кости, так как костные трабекулы были с неровными краями, разной толщины. Они сильно истончались, часто укорачивались и даже местами искривлялись (Рисунок 31).

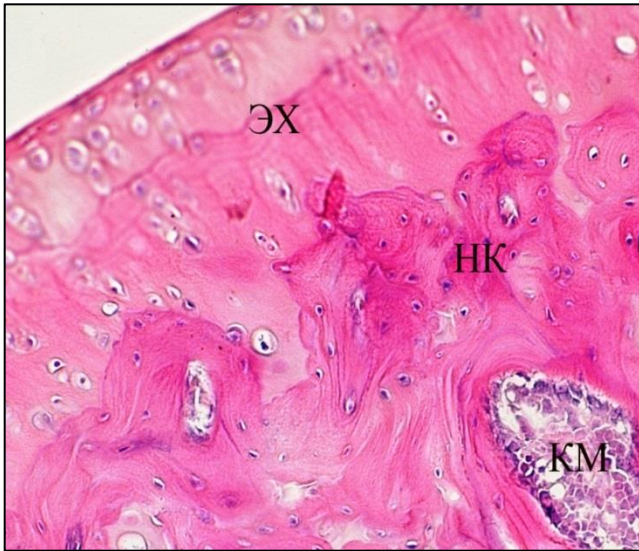


Рисунок 29 – Структура бедренной кости в области эпифиза у крысы опытной группы через 3 месяца после начала эксперимента
ЭХ – эпифизарный хрящ; КМ – костный мозг; НК – новообразованная костная ткань. Окраска гематоксилином и эозином. Увел. x200

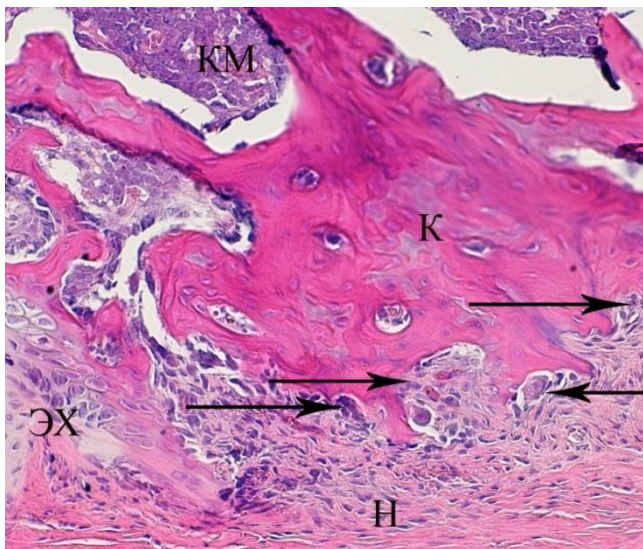


Рисунок 30 – Структура бедренной кости в области эпифиза у крысы опытной группы через 3 месяца после начала эксперимента
Н – надкостница; ЭХ – эпифизарный хрящ; КМ – костный мозг; К – костная ткань; остеокласты в узорах указаны стрелкой (↑). Окраска гематоксилином и эозином. Увел. x200

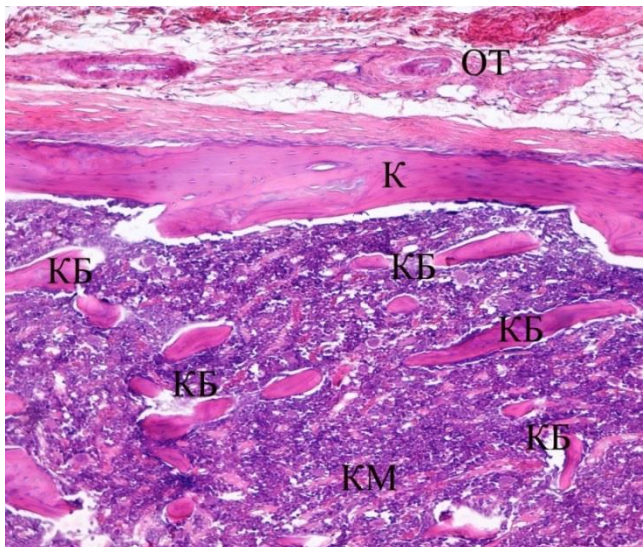


Рисунок 31 – Структура бедренной кости крысы опытной группы через 3 месяца после начала эксперимента

К – истонченная компактная костная ткань; КМ – костный мозг; КБ – резорбирующиеся костные балки губчатой кости. Окраска гематоксилином и эозином. Увел. x100

При больших увеличениях микроскопа даже на гистологических препаратах хорошо просматривается структура многоядерных остеокластов, резорбирующих

костные балки и структура «тающих» трабекул губчатой кости в костно-мозговом канале (Рисунок 32).

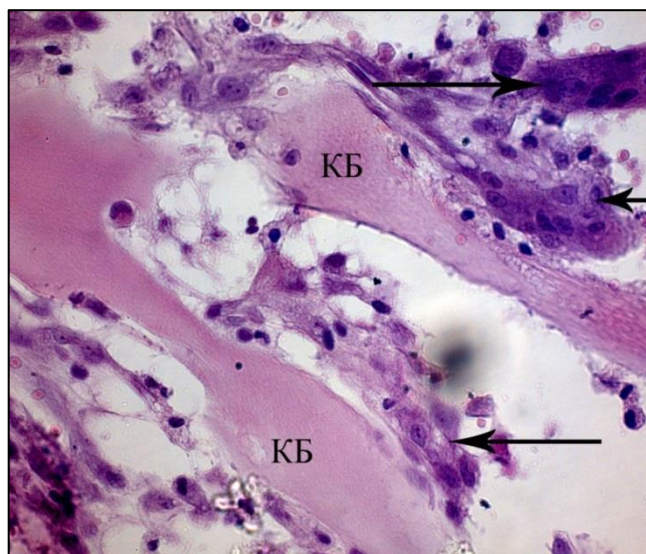


Рисунок 32 – Структура бедренной кости крысы опытной группы через 3 месяца после начала эксперимента

К – истонченная компактная костная ткань; КМ – костный мозг; КБ – резорбирующиеся костные балки губчатой кости; стрелками указаны остеокласты. Окраска гематоксилином и эозином. Увел. х400

Таким образом, при длительном (в течение 3-х месяцев) поступлении медно-цинковой колчеданной руды в организм экспериментальных крыс определяется постепенное усиление степени выраженности патоморфологических признаков в строении бедренной кости. Они заключаются в развитии деструктивно-дегенеративных изменений трубчатых костей, сопровождающихся, особенно в начальные сроки эксперимента (1 месяц), признаками компенсаторно-восстановительных процессов.

В результате действия элементов руды цветных металлов у экспериментальных крыс развивается интенсивная резорбция костной ткани, как пластинчатой, так и губчатой кости, а также эпифизарного хряща с нарушением минерализации межклеточного матрикса. Наибольшее проявление патологические резорбтивные процессы достигают к 3-м месяцам. И в диафизе, и в эпифизе трубчатых костей выявляются признаки усиления деструктивных процессов с усилением процессов резорбции, за счет чего постепенно снижается скорость энхондрального окостенения. Поэтому эти процессы приводят к истончению как эпифизарного хряща, так и кортикальной пластинки трубчатой кости, а также уменьшению количества губчатой кости.

По завершению трёхмесячного введения крысам суспензии порошка медно-цинковой колчеданной руды было проведено морфометрические исследования структуры бедренной кости (таблица 12).

Таблица 12 – Влияние интоксикации элементами медно-цинковой колчеданной руды в течение трёх месяцев на некоторые морфометрические показатели структуры бедренной кости, $\bar{X} \pm s_x$

Показатели	Группы крыс		Р
	Контрольная, n=10	Опытная, n=10	
Суммарная площадь костных балок эпифизов, мкм ²	2862 ± 109	2438 ± 146	0,047
Поперечный размер костных трабекул эпифиза, мкм	2,71 ± 0,19	2,14 ± 0,12	0,017
Толщина суставного хряща, мкм	7,48 ± 0,67	5,15 ± 0,42	0,007
Количество остеоцитов диафиза в поле зрения	10,8 ± 0,59	8,2 ± 0,81	0,035
Количество остеонов (гаверсовых каналов) диафиза в поле зрения	0,78 ± 0,076	0,70 ± 0,77	0,041
Поперечный размер стенки бедренной кости, мкм	11,23 ± 0,55	9,12 ± 0,78	0,044

У крыс опытной группы наблюдается статистически значимые снижения всех исследуемых показателей, характеризуя описанные изменения гистологической и электронномикроскопической структур трубчатой кости.

Результаты изучения гистологической структуры костной ткани опытной группы крыс подтверждают данные биохимических исследований, свидетельствующих о том, что в результате действия компонентов медно-цинковой колчеданной руды наблюдается развитие дисбаланса ремоделирования кости и нарушения минерального обмена.

3.6 Эффективность действия антиоксидантного препарата на систему глутатиона в костной ткани и печени при длительной интоксикации элементами медно-цинковой колчеданной руды

Моделирование длительного поступления элементов медно-цинковой колчеданной руды сопровождается резким снижением ключевого звена антиокислительной защиты тканей – восстановленного глутатиона и нарушением всей глутатионовой системы, а также истощением других компонентов физиологической антиоксидантной защиты.

В этой связи на следующем этапе исследований было принято решение изучить эффективность действия антиоксидантного препарата комплекса витаминов с микроэлементом.

Антиоксидантный препарат при введении животным основной группы на фоне интоксикации порошком руды способствовало улучшению состояния системы глутатиона в костной ткани (Таблица 13). Содержание восстановленного глутатиона и свободных тиоловых групп белков в основной группе животных было статистически значимо выше, чем в группе сравнения, подвергнутых интоксикации элементами руды цветных металлов без введения антиоксидантного препарата (Рисунок 33).

Увеличение содержания восстановленного глутатиона положительно отразилось на активности глутатионзависимых ферментов – глутатионпероксидазе, глутатион-S-трансферазе, гамма-глутамилтранспептидазе. Введение комплекса витаминов с микроэлементом животным также способствовало повышению активности ферментов восстановления глутатиона из окисленного состояния. Содержание восстановленного глутатиона, свободных сульфгидрильных групп, активность глутатионпероксидазы и гамма-глутамилтранспептидазы между основной группой крыс, получавшей витаминный препарат, и группой сравнения отличаются статистически значимо.

Таблица 13 – Показатели системы глутатиона в костной ткани крыс при интоксикации компонентами медно-цинковой колчеданной руды и введении антиоксидантного витаминного препарата, Me[Q₁-Q₃]

Показатели	Группа животных		
	Контрольная, n=12	Сравнения, n=10	Основная, n=12
Глутатион восстановленный, мкмоль/мг белка	2,10 [1,98-3,15]	1,51[1,19-2,03] PU=0,0140	1,90[1,77-2,31] PU=0,2132, PU ₁ =0,0481
Свободные SH-группы белков, мкмоль/мг белка	7,8[6,2-10,5]	6,08[5,25-7,96] PU=0,0143	7,24[6,17-8,03] PU=0,4281, PU ₁ =0,0345
ГПО, нмоль/мин×мг белка	2,10[1,54-2,56]	1,49[1,84-1,70] PU=0,0235	1,80[1,44-2,22] PU=0,0432, PU ₁ =0,0486
ГТ, нмоль/мин×мг белка	15,8[12,9-19,0]	13,5[9,8-18,4] PU=0,0383	14,9[14,4-17,8] PU=0,5251, PU ₁ =0,5054
ГР, нмоль/мин×мг белка	4,52[3,69-4,68]	3,75[2,82-4,03] PU=0,0282	3,89[3,09-4,81] PU=0,0442, PU ₁ =1,0
Г-6-фДГ, нмоль НАДФН/мин×мг белка	3,7[3,6-3,9]	3,03[2,9-3,62] PU=0,0486	3,16[2,9-2,68] PU=0,0409, PU ₁ =1,0
ГГТ, нмоль/мин×мг белка	13,4[11,9-14,2]	8,8[8,0-9,6] PU=0,0096	11,9[10,3-14,0] PU=0,0476, PU ₁ =0,0355
Примечание: PU – различия с группой контроля, PU ₁ – различия между основной группой и группой сравнения			

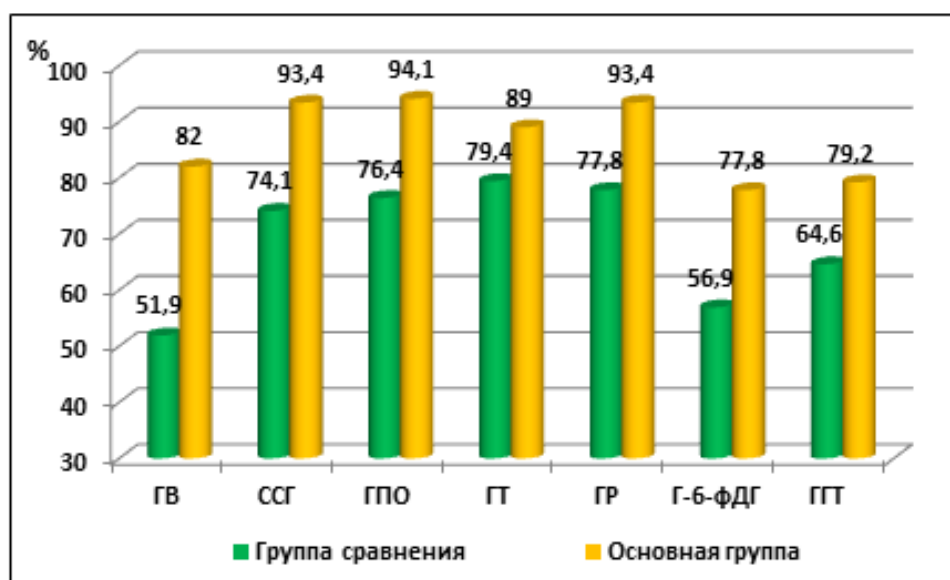


Рисунок 33 – Влияние введения антиоксидантного витаминного препарата на уровень показателей системы глутатиона в костной ткани крыс при интоксикации элементами медно-цинковой колчеданной руды (в % к контролю, принятому за 100%).

Введение антиоксидантного препарата приводило к повышению в костной ткани таких важнейших антиоксидантов, как α -токоферол и аскорбиновая кислота, активности ключевых ферментов защиты от окислительного стресса – супероксиддисмутазы и каталазы (Таблица 14). Если содержание аскорбиновой кислоты, которая синтезируется в тканях крыс из глюкозы, в основной группе и группе сравнения достоверно не отличались от контроля и между собой, то α -токоферола, активность супероксиддисмутазы и каталазы в костной ткани основной группы крыс были существенно выше, чем у животных группы сравнения ($P < 0,05$).

Таблица 14 – Эффективность применения витаминного препарата на уровень антиоксидантных витаминов и активность супероксиддисмутазы и каталазы в костной ткани при интоксикации компонентами медно-цинковой колчеданной руды, Ме [Q₁-Q₃]

Показатели	Группа животных			PU	PU ₁	PU ₂
	Контрольная, n=12	Сравнения, n=10	Основная, n=12			
Аскорбат, мкг/мг белка	2,38 [1,63-2,96]	1,73 [1,46-2,09]	2,0 [1,88-2,18]	0,265	0,825	0,328
α -токоферол, мкг/мг белка	11,31 [9,95-12,3]	9,2 [8,11-10,72]	10,32 [9,44-11,1]	0,046	0,284	0,019
СОД, Ед/мг белка	12,1 [9,2-13,0]	8,5 [7,2-9,2]	10,6 [8,9-12,6]	0,012	0,054	0,036
Каталаза, мкмоль/мин×мг белка	11,5 [9,5-13,6]	8,2 [6,6-11,3]	10,3 [8,1-12,9]	0,038	0,244	0,047
Примечание: PU – различия группы сравнения с контрольной группой, PU ₁ – различия между контрольной и основной группами, PU ₂ – различия между группой сравнения и основной группой						

Введение витаминного препарата с антиоксидантным действием на фоне поступления компонентов руды ингибировала интенсивность липопероксидации, снижая в костной ткани содержание первичных и вторичных продуктов (Таблица 15).

Таблица 15 – Уровень продуктов липопероксидации в костной ткани при интоксикации крыс компонентами руды и введении антиоксидантного витаминного препарата, Ме [Q₁-Q₃]

Показатели	Группа животных			PU	PU ₁	PU ₂
	Контрольная, n=12	Сравнения, n=10	Основная, n=12			
ТБК-АР, мкмоль/г	1,68 [1,51-1,84]	3,87 [2,81-4,06]	2,18 [2,02-2,42]	0,002	0,024	0,028
ДК гепт. фазы, усл. ед./г	0,92 [0,84-1,06]	1,48 [1,06-1,88]	1,07 [0,91-1,19]	0,031	0,042	0,051
КД и СТ гепт.ф., усл.ед./г	0,80 [0,72-0,89]	0,98 [0,82-1,09]	0,89 [0,81-0,98]	0,005	0,066	0,134
ДК изоп. фазы, усл.ед./г	1,21 [1,08-1,40]	1,97 [1,48-2,64]	1,40 [1,2-1,54]	0,008	0,036	0,042
КД и СТ изопр.ф., усл.ед./г	1,76 [1,58-1,84]	2,78 [2,43-2,91]	2,04 [1,91-2,38]	0,006	0,047	0,024

Таким образом, применение комплекса витаминов с микроэлементом на фоне внутрижелудочного введения суспензии порошка полиметаллической руды цветных металлов приводит в костной ткани к повышению параметров системы глутатиона, способствуют повышению содержания основных неферментативных компонентов и активности ключевых ферментов антиокислительной защиты клеток, сопряженно функционирующих с глутатионовой системой – супероксиддисмутазы и каталазы. Интенсивность перекисного окисления липидов в костной ткани при этом снижается.

Установленные изменения в системе глутатиона и процессов свободно-радикального окисления в костной ткани при введении антиоксидантного витаминного препарата нашли позитивное отражение в ремоделировании (Таблица 16).

У животных основной группы относительно группы сравнения снижалось в плазме крови содержание свободного оксипролина, характеризуя торможение катаболизма коллагена, а также маркёр резорбции кости С-концевые телопептиды коллагена типа I (Рисунок 34). Уровень маркёра костеобразования – КЩФ при этом несколько увеличивался, но это повышение не было достоверным.

Таблица 16 – Уровень маркёров ремоделирования костной ткани и свободного оксипролина в плазме крови при введении антиоксидантного витаминного препарата на фоне интоксикации элементами руды цветных металлов, Ме [Q₁-Q₃]

Показатели	Группа животных			PU	PU ₁	PU ₂
	Контрольная, n=10	Сравнения, n=10	Основная, n=12			
Свободный оксипролин, мкмоль/л	14,2 [13,0-15,9]	19,6 [17,4-21,0]	16,3 [14,8-17,6]	0,007	0,042	0,031
КЩФ, Ед/л	6,17 [4,33-6,97]	6,23 [4,92-6,78]	6,41 [4,27-6,88]	0,722	0,904	0,678
СТх, нг/л	0,618 [0,528-0,664]	1,317 [1,208-1,512]	0,868 [0,685-0,936]	0,018	0,045	0,034

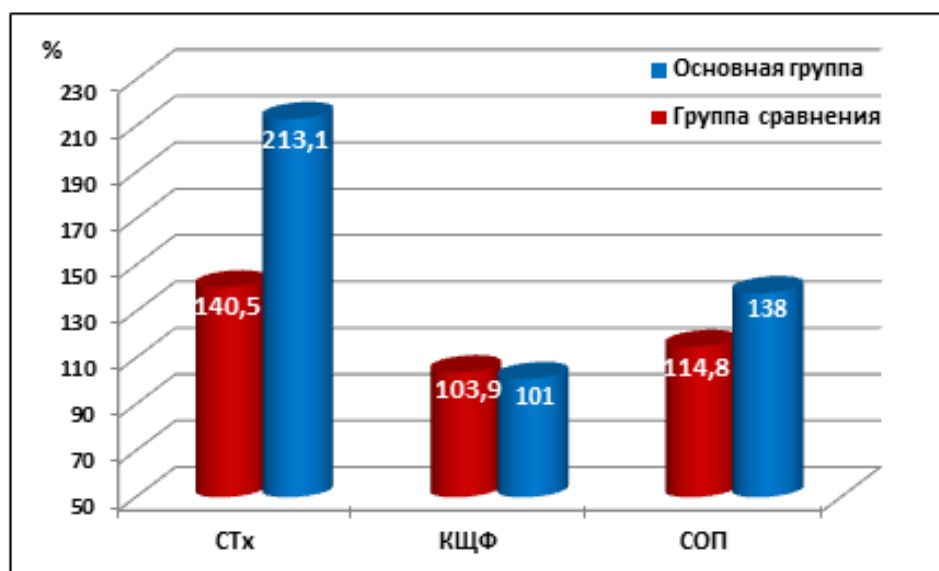


Рисунок 34 – Влияние введения комплекса витаминов с микроэлементом на уровень маркёров ремоделирования костной ткани при интоксикации элементами медно-цинковой колчеданной руды (в % к контролю, принятому за 100%; СОП – свободный оксипролин).

Одновременно наблюдалось улучшение минерального обмена у животных группы, получавшей комплекс витаминов с микроэлементом (Таблица 17). Содержание Са и Р в плазме крыс основной группы снижалось, а Mg – увеличивалось относительно группы сравнения. Это приводило к увеличению и соотношения Са/Mg. У крыс контрольной группы коэффициент Са/Mg составлял $3,00 \pm 0,102$, в группе сравнения $1,92 \pm 0,125$ ($P=0,008$), в основной группе $2,75 \pm 0,116$ ($P_1=0,248$, $P_2=0,033$).

Таблица 17 – Показатели минерального обмена в плазме крови крыс при введении антиоксидантного препарата на фоне интоксикации элементами руды, $\bar{X} \pm s_x$.

Показатели	Группа животных			P	P ₁	P ₂
	Контрольная, n=10	Сравнения, n=10	Основная, n=10			
Ca, ммоль/л	2,40±0,091	2,0±0,114	2,26±0,104	0,038	0,133	0,0672
P, ммоль/л	1,33±0,047	1,10±0,054	1,21±0,063	0,029	0,073	0,068
Mg, ммоль/л	0,80±0,058	1,04±0,042	0,84±0,035	0,021	0,711	0,032

При изучении глутатионовой системы в ткани печени у животных, получавших комплекс витаминов с микроэлементом на фоне интоксикации компонентами руды, был также установлен позитивный эффект (Таблица 18). У крыс опытной группы против группы сравнения статистически выше было содержание восстановленного глутатиона, активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и гамма-глутамилтранспептидазы.

Таблица 18 – Компоненты системы глутатиона в печени крыс при действии элементов медно-цинковой колчеданной руды и введении комплекса витаминов с микроэлементом, Me[Q₁-Q₃]

Показатели	Группа животных			PU	PU ₁	PU ₂
	Контрольная, n=10	Сравнения, n=8	Основная, n=8			
ГВ, мкмоль/мг белка	13,3 [10,9-16,7]	6,9 [6,3-8,1]	10,9 [9,9-12,8]	0,001	0,037	0,015
ССГ, мкмоль/мг белка	16,6 [16,0-20,0]	12,3 [10,2-16,3]	15,5 [14,6-18,7]	0,028	0,033	0,065
ГПО, нмоль/мин×мг белка	7,34 [6,76-10,25]	5,61 [4,76-9,01]	6,91 [6,1-8,37]	0,032	0,544	0,138
ГТ, нмоль/мин×мг белка	146 [136-153]	116 [106-137]	130 [119-147]	0,029	0,048	0,082
ГР, нмоль/мин×мг белка	110,3 [92,6-121,6]	85,8 [80,1-96,9]	103,0 [81,9-110,8]	0,028	0,038	0,517
Г-6-фДГ, мкмоль НАДФН/мин×мг белка	0,72 [0,65-0,74]	0,41 [0,39-0,44]	0,56 [0,51-0,67]	0,001	0,025	0,006
ГГТ, мкмоль/мин×мг белка	4,8 [4,3-5,2]	3,1 [2,7-3,5]	3,8 [3,0-4,2]	0,000 1	0,019	0,002

Примечание: PU – различия с группой контроля, PU₁ – различия между основной группой и группой сравнения.

Содержание свободных тиольных групп белков, активность глутатионпероксидазы, глутатион-S-трансферазы, глутатионредуктазы хотя и были больше у крыс основной группы, чем в группе сравнения, однако эти различия не достигали статистической значимости (Рисунок 35).

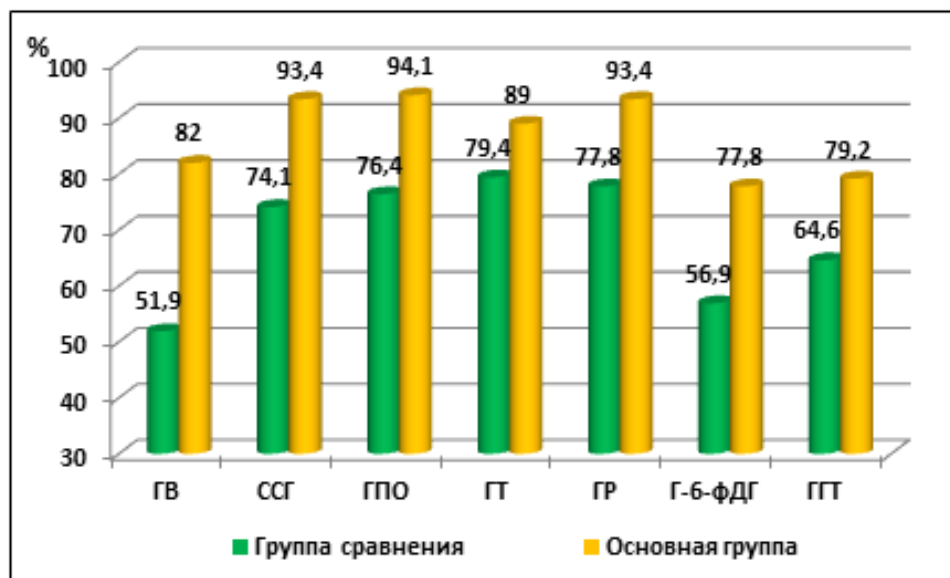


Рисунок 35 – Влияние витаминного антиоксидантного препарата на уровень компонентов системы глутатиона в печени крыс при интоксикации элементами медно-цинковой колчеданной руды (в % к контролю, принятому за 100%).

В печени основной группы крыс под влиянием комплекса витаминов с микроэлементом повышалась также концентрация α -токоферола, аскорбиновой кислоты, активность супероксиддисмутазы и каталазы (Таблица 19, Рисунок 36). При этом содержание аскорбата, α -токоферола, общая антиокислительная активность ткани и активность в ней супероксиддисмутазы статистически значимо не отличались от контрольных значений.

Таблица 19 – Содержание антиоксидантных витаминов, общая антиокислительная активность, активность супероксиддисмутазы и каталазы в печени крыс при введении комплекса витаминов с микроэлементом на фоне интоксикации элементами руды, Me [Q₁-Q₃]

Показатели	Группа крыс			PU	PU ₁	PU ₂
	Контрольная, n=10	Сравнения, n=8	Основная, n=8			
α-токоферол, мкг/мг белка	5,64 [4,76-5,89]	4,70 [4,12-5,55]	5,31 [4,56-5,74]	0,032	0,713	0,043
Аскорбат, мкг/мг белка	13,6 [12,4-14,8]	11,2 [10,4-12,7]	12,6 [10,6-13,8]	0,036	0,094	0,047
СОД, Ед/мг белка	10,9 [8,6-12,0]	7,3 [6,2-8,2]	8,8 [8,1-10,4]	0,027	0,040	0,048
Каталаза, мкмоль/мин×мг белка	9,5 [8,3-9,9]	7,6 [6,4-8,5]	8,3 [7,7-9,0]	0,055	0,176	0,483
ОАА, %	44,3 [38,8-47,9]	32,6 [27,4-37,7]	40,2 [37,5-45,6]	0,024	0,215	0,0378

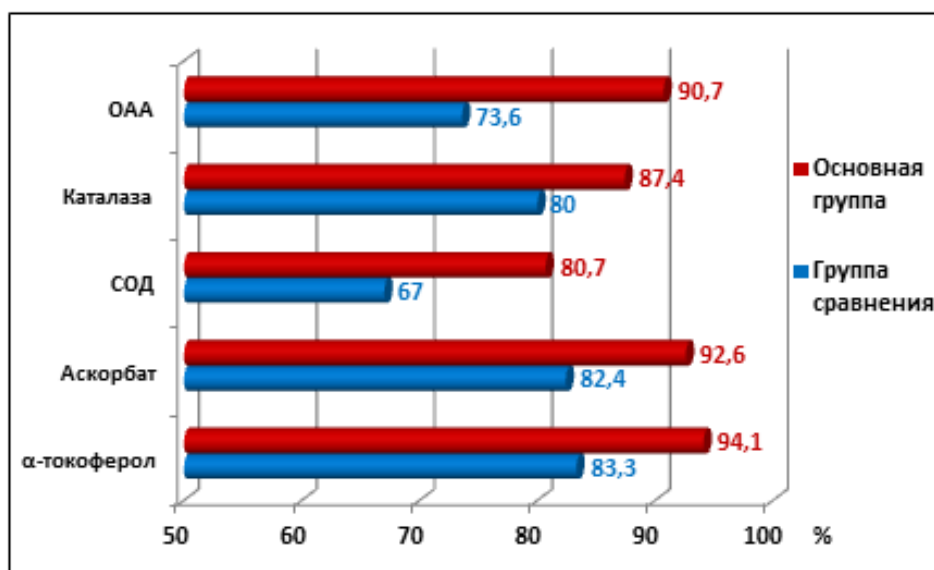


Рисунок 36 – Уровень некоторых показателей антиоксидантной защиты печени крыс при введении комплекса витаминов с микроэлементом на фоне интоксикации компонентами медно-цинковой колчеданной руды (в % к контролю, принятому за 100%).

Резюмируя полученные результаты, можно констатировать, что введение животным антиоксидантного витаминного препарата на фоне продолжающегося

поступления в организм токсичных элементов медно-цинковой колчеданной руды способствует улучшению состояния глутатионовой системы в тканях печени и костей, повышая содержание восстановленного глутатиона, активность глутатионзависимых ферментов, ферментов, участвующих в восстановлении глутатиона, и также других ключевых компонентов неферментативного (аскорбиновая кислота, α -токоферол) и ферментативного (СОД, каталаза) звеньев антиоксидантной защиты.

Глава 4 Обсуждение результатов исследования

При длительном контакте химические факторы, оказывающие негативное действие на организм, даже в низких концентрациях вызывают системные изменения физиологического состояния организма, создавая предпосылки для нарушения здоровья, снижая резистентность и сопротивляемость организма. Особое внимание с этих позиций заслуживают рабочие промышленных предприятий, которые по характеру профессиональной деятельности, подвергаются воздействию химических поллютантов. Нарушения метаболических процессов, включая энергетический потенциал клеток, окислительная и неокислительная модификация биополимеров (нуклеиновых кислот, белков, полисахаров), липидных компонентов биомембран, развитие гипоксии, изменения реакции клеток и субклеточных структур на действие физиологических регуляторных сигналов, образование токсичных продуктов характеризуют некоторые звенья действия химических токсикантов. Как результат, возникает химическая травма, оказывающая действие на отдельные системы, ткани и органы. Вредные условия труда с воздействием химических факторов являются причиной не только профессиональной патологии, но и, нередко, основой развития и прогрессирования общих заболеваний, нарушения здоровья в отдалённом постконтактном периоде [5].

Распространённой группой, обладающей токсическим действием, являются тяжёлые металлы и некоторые другие элементы, которые в отличие от органических соединений не подвергаются биотрансформации, и, поступая в организм, способны концентрироваться и перераспределяться между различными тканями и средами. Целый ряд элементов, например, ртуть, свинец, кадмий, талий, мышьяк имеют уникальные токсические характеристики и вызывают поражения уже в следовых количествах [71, 154].

Заметными источниками поступления тяжёлых металлов и некоторых других токсичных элементов во внешнюю среду и организм человека являются предприятия горнорудной промышленности, добычи и обогащения цветных металлов

и полиметаллических руд. В структуре накопленной заболеваемости болезни костно-мышечной системы и соединительной ткани на этих производствах занимают высокое ранговое место, наряду с болезнями сердечно-сосудистой, дыхательной и пищеварительной систем [53, 59, 64]. Такой высокой распространенности болезней костно-мышечной системы способствует и ранее развитие у работников остеопении и остеопороза, которые характеризуются снижением костной массы, нарушениями в архитектонике костной ткани, приводящими к уменьшению механической прочности и учащению переломов. Снижение минеральной плотности костной ткани у рабочих предприятий по добыче и обогащению цветных металлов отражающий развитие системной остеопении и остеопороза выявляется в 2-4 раза чаще, чем у работников других производств [36, 50, 76]. Формирование остеопении у горняков Учалинского горно-обогатительного комбината, добывающих медно-цинковую руду подземным способом наблюдается уже в молодом возрасте, а снижение костной минеральной плотности коррелирует со стажем работы в этих условиях. В волосах у них установлено многократное повышение содержания меди, цинка, кадмия, хрома, более двух раз – магния, свинца, ртути, мышьяка по сравнению с группой лиц, работающих на других предприятиях, характеризуя поступление в организм и накопление элементов, содержащихся в рудах [36]. У работников, занятых добычей и переработкой медно-цинковых колчеданных руд на этом же предприятии, установлено значительное превышение содержания в ротовой жидкости Cd, Hg, Zn, As, Pb, Cr, Fe, Ca, Mn, Cu, Mg, в твердых зубных отложениях Cu, Zn, Fe, Mn, Ca, Mg, Pb, Hg [75]. Эти результаты свидетельствуют о формировании элементного гомеостаза в биологических жидкостях и тканях организма работников за счет поступления металлов и других элементов из промышленной аэрозоли воздуха рабочей зоны. Основным неблагоприятным фактором производственной среды у горняков, добывающих руду подземным способом, является рудная пыль, выделение которой сопровождает все основные этапы технологического процесса добычи руды. Содержание пыли при выполнении основных технологических процессов составляет от 1 до 2 ПДК, а рудная пыль на 90% является высокодисперсной [59].

Накопление в костях ряда тяжелых металлов (Cu, Sr, Zn, Hg, Pb, Cd, Fe, Mn) было установлено при моделировании длительной интоксикации экспериментальных животных путем дозированного внутрижелудочного введения суспензии порошка медно-цинковой руды [22, 74, 76]. Действие избыточного накопления этих элементов проявлялось нарушением остеобласто- и остеокластогенеза, усилением интенсивности свободнорадикального окисления, изменениями регуляции обменных процессов в костной ткани [50]. Однако ряд патохимических механизмов остеотоксического действия элементов, содержащихся в полиметаллических рудах, требовали дальнейшего изучения. Особое внимание с этих позиций привлекала система глутатиона, играющая ведущую роль в детоксикации тяжелых металлов и других токсичных элементов, в процессах биотрансформации, в функционировании всей многоуровневой системы антиоксидантной защиты и состояния редокс-статуса клетки в целом. Таким образом, данная работа является продолжением изучения патогенетических механизмов повреждения костной ткани при действии компонентов медно-цинковой колчеданной руды.

Целью исследования явилось выявление патогенетической значимости в развитии остеопении при воздействии комплекса элементов медно-цинковой колчеданной руды системы глутатиона и оценка эффективности коррекции метаболических изменений костной ткани витаминным препаратом антиоксидантного действия.

Для моделирования длительного действия элементов полиметаллической руды на костную ткань осуществляли ежедневное введение суспензии мелко растертого порошка медно-цинковой колчеданной руды, добываемой на Учалинском месторождении ОАО «Учалинский горно-обогатительный комбинат», в 2% растворе крахмала с помощью специального зонда в течение трех месяцев из расчета 60 мг на 100 г массы крысы. При расчете вводимой дозы исходили из минимальной ПДК меди, кадмия и содержания их в руде.

Результаты проведенных исследований показали, что поступление компонентов медно-цинковой руды вызывает у экспериментальных животных нарушения ремоделирования костной ткани с превалированием резорбционных процес-

сов, начиная с первого месяца наблюдения. Метаболические изменения в костной ткани у опытной группы крыс нарастали постепенно, достигая выраженных изменений к завершению третьего месяца эксперимента. Об этом свидетельствовали увеличение в плазме крови животных содержания свободного оксипролина, С-концевых телопептидов коллагена типа I. Уровень активности костного изофермента щелочной фосфатазы в первый месяц эксперимента несколько возрастал, характеризуя интенсификацию и процессов костеобразования, однако в последующие сроки наблюдения снижался до значений у животных контрольной группы.

Костная ткань играет роль депо организма для поддержания уровня в крови и других биологических жидкостях кальция, фосфора, магния и некоторых других минеральных компонентов. В костной ткани определяются 99% кальция, 80% фосфора и 66% магния, содержащихся в организме в целом [46]. В этой связи на нарушения костного метаболизма при действии элементов, содержащихся в руде, указывают и результаты определения в плазме крови содержания Ca, P и Mg. Уровни Ca и P при этом снижались, а Mg повышался. Полученные результаты не противоречат данным об уменьшении концентрации Mg в костной ткани экспериментальных животных в аналогичных условиях моделирования действия элементов медно-цинковой руды [22, 50].

Анализ данных, полученных в этой серии экспериментов, свидетельствуют, что в костной ткани животных, подвергшихся воздействию элементов руды, усиливается катаболизм основного белка внеклеточного матрикса-коллагена. Это находит свое отражение в повышении уровней в крови свободного оксипролина и С-концевых телопептидов коллагена типа I. Одновременно наблюдается интенсификация разрушения и минерального вещества костной ткани с изменением показателей минерального обмена в крови. Повышение резорбции костной ткани на фоне сохранения физиологического уровня процессов костеобразования приводит к постепенному нарастанию деструктивных процессов, нарушению микроархитектоники и ультраструктуры компактного и губчатого вещества костной ткани, подтверждаемого гистологическими, морфометрическими и электронно-микроскопическими исследованиями. Проявления деструктивных явлений нара-

тали в костной ткани по мере увеличения продолжительности интоксикации суспензией порошка полиметаллической руды. На гистологических препаратах бедренной кости наблюдались истончение ткани в области диафиза с образованием глубоких узуров, прорастание рыхлой соединительной ткани в кость со стороны надкостницы. В костных клетках при электронно-микроскопическом исследовании обнаруживались выраженные признаки деструкции всех внутриклеточных органелл. Наиболее заметные изменения при этом наблюдались в остеоцитах. Во многих лакунах костной ткани выявлялись только фрагменты разрушенных остеоцитов. Интенсивная резорбция костных балок обнаруживалась в губчатой кости эпифизов бедренных костей. В узурах и резорбционных полостях хорошо просматривались многоядерные активные остеокласты. Вместе с тем на некоторых участках кости крыс опытной группы определялись зоны костеобразования с активными остеобластами.

Полученные результаты подтверждают полученные ранее данные о снижении минеральной плотности костной ткани и прочности костей у горняков, добывающих медно-цинковую колчеданную руду подземным способом [22], а также данные биохимических исследований костной ткани с моделированием интоксикации крыс компонентами полиметаллической руды, отражающие дискоординацию процессов резорбции и остеогенеза, остеокластогенеза и остеобластогенеза [50, 74, 76].

В механизмах поддержания параметров минерального обмена основная роль отводится остеоцитам [1]. Увеличение содержания в костях периферического и лицевого скелета ряда металлов (Fe, Mn, Cu, Zn, Cd, Pb, Hg, Cr, Sr) при интоксикации экспериментальных животных суспензией порошка руды, несомненно, отражается на функционировании костных клеток, на процессах остеоцитарного ремоделирования и минерального обмена между костью и циркулирующими жидкостями. Минеральные нанокристаллы в костной ткани имеют форму пластинок, также располагаются полиморфными группами с гранулярной, игольчатой, палочковидной и округлой формами [48], что способствует образованию значительной общей площади кристаллов гидроксиапатита и интенсивному ионному

обмену кристаллов с внеклеточной средой [1]. Это объясняет активное участие костной ткани в метаболизме большинства макро- и микроэлементов и чувствительную реакцию на изменения их баланса, а также на попадание в организм высокотоксичных элементов, таких как Cd, Hb, Pb, Cr, As [71]. Ионы кальция в кристаллической решетке гидроксиапатита замещаются на ионы других металлов при их избыточном поступлении, снижая прочность и нарушая метаболизм костной ткани. Особенно легко эти замещения осуществляются при увеличении содержания ионов щелочно-земельных элементов - бария, радия, стронция, а также, хотя и более трудно, ионами других металлов. Особо высокую тропность проявляет свинец, до 90% поступающего в организм Pb накапливается в костной ткани. Эти замещения вызывают нарушения фосфорно-кальциевых отношений в кости и минерального обмена в организме.

Обмен, циркуляция, депонирование ионов металлов во многом объясняется их участием в процессах комплексообразования и взаимодействия с природными лигандами - белками, пептидами, нуклеиновыми кислотами, гликозаминогликанами и др. [71]. Поддержание металлолигандного гомеостаза является одним из условий физиологического течения метаболических процессов и функционирования отдельных органов, тканей, систем и организма в целом. Накопление целой группы металлов в костной ткани при длительном поступлении в организм компонентов руды цветных металлов, несомненно, вызывает нарушение металлолигандного гомеостаза, оказывая токсическое действие. Патогенетические механизмы их токсического действия могут быть весьма разнообразными, изменяя формы нахождения элементов в клетках в виде кластеров, комплексов, ионной или молекулярной; нарушая синергичные или антагонистические координированные влияния элементов; вызывая конкуренцию за образование биок комплексов с эссенциальными элементами в моно- и/или полидентантных металлопротеинах, ингибируя или активируя ферменты, рецепторы, транспортные белки, компоненты систем внутриклеточных сигнальных путей, влияя на процессы пролиферации, апоптоза, хемотаксиса, адгезии и др. [71, 154].

Токсические эффекты значительной группы металлов (прежде всего тяжелых) обусловлены образованием прочных комплексов с аминокислотами и другими биомолекулами, содержащими тио- или алкилтиогруппировки. Избыточное накопление эссенциальных металлов с переменной валентностью и особенно токсичных металлов провоцирует в тканях генерацию активных форм кислорода и интенсификацию свободнорадикальных процессов. Система глутатиона является самой лабильной и мощной защитой от действия тяжелых металлов, с одной стороны, а с другой – важнейшей частью антиоксидантной системы тканей [28].

Изучение содержания свободного глутатиона и свободных сульфгидрильных групп белков в костной ткани при длительном поступлении элементов медно-цинковой колчеданной руды выявило резкое до 69,1% снижение содержания восстановленного глутатиона: через месяц после начала интоксикации крыс суспензией порошка руды, а к завершению 3-го месяца эксперимента уровень ГВ упал до 59,9% от контрольных параметров. Содержание свободных сульфгидрильных групп белков снижался более постепенно и менее выражено, составляя 76,7% от контроля к концу эксперимента. При этом в костной ткани также наблюдалось снижение активности глутатионсвязанных ферментов – глутатионпероксидазы и глутатионтрансферазы. Развитие тканевого дефицита восстановленного глутатиона вследствие образования прочных комплексов с тяжелыми металлами является наиболее вероятной причиной снижения активности глутатионпероксидазы и глутатионтрансферазы. Однако не исключена возможность влияния на функциональное состояние этих ферментов и действия активных форм кислорода, продуктов свободнорадикального окисления и нарушения регуляторных процессов антиоксидант-респонсивного элемента. На это в частности указывает снижение уровня свободных сульфгидрильных групп белков.

Одновременно при интоксикации элементами медно-цинковых колчеданных руд в костной ткани существенно страдает система восстановления глутатиона. Активность глутатионредуктазы также снижается, хотя и в меньшей степени, чем ГПО и ГТ. Падение активности глутатионредуктазы вероятно связано со снижением интенсивности течения в костной ткани гексозомонофосфатного пути

окисления, генерирующего в цитоплазме уровень восстановленного НАДФН. Об этом свидетельствует значительное уменьшение у опытной группы животных активности ключевого фермента данного пути глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, чувствительного к металлам, связывающим SH-группы [11, 71].

Снижение активности γ -глутамилтранспептидазы характеризует при действии токсичных металлов торможения поступления в клетки костной ткани аминокислот, особенно необходимых для синтеза глутатиона *de novo*.

Таким образом, при длительном действии элементов, содержащихся в медно-цинковой колчеданной руде, в костной ткани в значительной мере нарушается функционирование глутатионовой системы – снижается уровень восстановленной формы этого трипептида со смещением тиол-дисульфидного равновесия, что приводит к падению активности глутатионзависимых ферментов антиоксидантной защиты и процессов второй фазы биотрансформации ксенобиотиков, связанных с функцией глутатион-S-трансфераз. Процессы восстановления глутатиона при этом подавлены, как и обеспечение клеток костной ткани необходимыми для синтеза глутатиона аминокислотами, наблюдается ингибирование глутаминового цикла. Нарушения метаболизма глутатиона отражается на уровне свободных сульфгидрильных групп белков, содержание которых также значительно снижается. Активность ферментов восстановления тиоловых групп белков тиоредоксина и глутаредоксина, зависящих от редокс-потенциала клетки и соотношения восстановленных и окисленных форм пиридиновых нуклеотидов, очевидно, также страдает, тем более, что в функционировании и тиоредоксина, и глутаредоксина SH-группы играют ключевую роль [82].

Состояние тиол-дисульфидного равновесия существенно отражается на механизмах пролиферации, дифференцировки и апоптоза клеток, что в костной ткани непосредственно связано с процессом ремоделирования. Глубокое истощение свободного глутатиона способствует развитию апоптоза, некроза и ферроптоза [83, 134]. Под контролем тиолдисульфидного равновесия находится функциональная активность факторов транскрипции и их взаимодействие с регуляторными сайтами ДНК. Установлено более 20 транскрипционных факторов, занимаю-

щие ключевые позиции в регуляции программ клеточного развития [87]. Они способны изменить экспрессию нескольких сотен генов и функционирование значительной группы ферментативных реакций в клетке. Важно, что механизмы регуляции контроля активности факторов транскрипции, включают взаимодействие с металлами переменной валентности, которые входят в структуры этих редокс-сенсоров – NF-kB, AP-1, Nrf-2, и окисление цистеиновых остатков в молекулах указанных факторов [105].

NF-kB является уникальным среди транскрипционных регуляторных белков, играет роль внутриклеточного интегрирующего медиатора, активируемого большим числом внутриклеточных путей и запускающего быструю активацию множества генов. Модификация SH-групп в N-концевом домене Rel-протеинов (p50, p52, p65, p100, p105, c-Rel) нарушает связывание фактора NF-kB с регуляторным сайтом ДНК и изменяет транскрипционную активность [28]. Восстановленное состояние остатков цистеина белков c-FOS и c-Jun необходимо для взаимодействия с ДНК другого фактора транскрипции AP-1 [101]. Чувствительные к окислению и модификации остатки цистеина имеет белок Кеар-2, связывающий Nrf-2, и сам фактор транскрипции Nrf-2, взаимодействующий с антиоксидант-респонсивным элементом. Антиоксидант-респонсивный элемент имеет среди редокс-чувствительных транскрипционных факторов ключевое значение [91]. Для индукторов APE характерны электрофильность и способность модифицировать SH-группы белков, что является ведущим механизмом токсического действия большинства тяжелых металлов и токсичных элементов. APE контролирует экспрессию ферментов антиоксидантной защиты и биотрансформации [28, 155], а также ключевой фермент синтеза глутатиона γ -глутамил-цистеин-лигазы. Это позволяет клеткам с участием APE, факторов транскрипции повышать концентрацию восстановленного глутатиона, тиол-дисульфидного баланса и процессов биотрансформации при действии значительного круга экстремальных воздействий. Hg, Cd, Pb, Cr повреждают в клетках сигнальные пути [142] и при интоксикации элементами медно-цинковой колчеданной руды существенно нарушаются

все указанные механизмы адаптации костной ткани в результате накопления в этих тяжелых эссенциальных и токсичных металлов.

Система глутатиона тесно связана с другими неферментативными и ферментативными компонентами антиоксидантной защиты. В клетках имеется цепь глутатион-аскорбиновая кислота- α -токоферол, которая транспортирует электроны в составе атомов водорода от восстановленных пиридиновых нуклеотидов (НАДН, НАДФН) к свободным радикалам [28]. При действии элементов, содержащихся в медно-цинковой руде, в костной ткани наблюдается нарушение содержания компонентов этой цепи. В ткани опытной группы крыс установлено снижение содержание α -токоферола – главного перехватчика радикалов липидной фазы биологических мембран, а также аскорбиновой кислоты, хотя и в меньшей степени, что возможно связано с тем, что в тканях крысы функционирует глюкуронол-ксилозульный цикл синтеза аскорбиновой кислоты [93]. Снижение уровня аскорбиновой кислоты, вероятно, связано с ингибированием интенсивности течения гексозомонофосфатного (пентозофосфатного) пути окисления глюкозы, поскольку восстановление из глюкуроновой гулоновой кислоты – предшественника аскорбата катализируется глюкуронолредуктазой (КФ 1.1.1.19), для функционирования которой необходим восстановленный НАДФН. Окисленные формы аскорбиновой кислоты семидегидроаскорбат и дегидроаскорбат частично редуцируются с участием восстановленного глутатиона – GSH-зависимой цитозольной дегидроаскорбатредуктазой, а восстановленная форма аскорбата необходима для регенерации окисленного α -токоферола [28].

При действии тяжелых металлов и других токсичных элементов, содержащихся в полиметаллических рудах, одновременно с глутатионпероксидазой и глутатионтрансферазой в костной ткани снижается активность и других ключевых ферментов антиокислительной защиты - супероксиддисмутазы и каталазы. Если активность СОД снижается постепенно (на первый месяц не отличается достоверно от контроля) и существенно изменяется через 2 и 3 месяца интоксикации, то активность каталазы выраженно падает уже в первый месяц наблюдения.

Снижение уровня антиокислительной защиты может быть как причиной длительной интенсификации свободнорадикальных процессов, так и ее следствием. У животных опытной группы в костной ткани при длительной интоксикации суспензией порошка полиметаллической руды уровень ТБК-активных продуктов повышается более двух раз, а первичных и вторичных продуктов липопероксидации в гептановой и изопропаноловых фазах - более полутора раз. Металлы переменной валентности Fe, Cu, Mn, Cr, Ni, Cd, Pb, Hg индуцируют перекисное окисление липидов, стимулируя образование активных форм кислорода, в том числе наиболее агрессивного и токсичного - гидроксилрадикала. В организме не существует ферментов, элиминирующих гидроксилрадикал, и единственной эффективной защитой является предотвращение образования $\text{OH}^{\bullet}$ путем трансформации его предшественника пероксида водорода в воду глутатионпероксидазой и каталазой. Снижение активности основных антиоксидантных ферментов при действии тяжелых металлов может быть связано не только непосредственным действием большинства из них на тиоловые и другие функциональные группы, но окислительной деструкцией за счет оксидативного повреждения, или вмешательства в механизмы регуляции их транскрипции, активности факторов транскрипции. Ряд активных кислородных реагентов проявляют ингибирующую активность по отношению к антиоксидантным ферментам – СОД, каталазы и ГПО. Эти ферменты могут быть инактивированы продуктами их каталитической активности, и только совместное их функционирование защищает друг друга от окислительного повреждения активными формами кислорода. Так, СОД предохраняет каталазу и ГПО от инактивирующего действия супероксид-анион-радикала ($\text{O}_2^{\bullet -}$), а ГПО и каталаза, в свою очередь, защищает СОД от инактивации пероксидом водорода [28]. Связывая супероксид-анион-радикал СОД предупреждает образование гидроксилрадикала, предотвращая развитие цепных реакций свободнорадикального окисления. Продукты перекисного окисления липидов, пероксид водорода, гидроксилрадикал, пероксинитрит являются потенциальными ингибиторами ГПО, имеются сведения об ингибирующем действии на ГПО и каталазу H_2O_2 , OCl^- , $\text{OH}^{\bullet}$ [180]. СОД инактивируется H_2O_2 , но органические пероксиды и гидроксилрадикал

не оказывают действия на ее активность [186]. Показано, что выраженность инактивации СОД в культурах клеток в присутствии ГПО и каталазы значительно ниже при действии активных форм кислорода, что показывает кооперативное действие антиоксидантных ферментов в клетках при развитии оксидативного стресса, обеспечивая синергичную защиту от активных форм кислорода и сохраняя их максимальную биологическую активность.

Активные кислородные реагенты угнетают активность не только антиоксидантных ферментов, но и значительной группы энзимов, включая дегидрогеназы углеводного обмена и цикла трикарбоновых кислот, что приводит к снижению редокс-системы и буферной емкости антиоксидантной защиты. В условиях снижения буферной емкости антиокислительной защиты белки клеточных структур, ферменты, рецепторы и другие становятся более доступными для свободнорадикальной атаки. Окислительное повреждение белковых молекул, по мнению ряда авторов [67] при окислительном стрессе начинается раньше, чем липидов биологических мембран.

Наиболее интенсивный биосинтез глутатиона осуществляется в печени. Печень является основным органом поддерживающим уровень циркулирующего в плазме крови глутатиона, тогда как остальные органы утилизируют его путем транспорта через плазматические мембраны и внутриклеточного ресинтеза в глутаминовом цикле [37]. Печень является, таким образом, органом, обеспечивающим остальные ткани организма глутатионом. Изучение содержания в печени компонентов системы глутатиона представлял непосредственный интерес с позиции поддержания уровня глутатиона в костной ткани при действии тяжелых металлов и токсичных элементов, содержащихся в медно-цинковой колчеданной руде. Ранее проведенные исследования на кафедрах биологической химии и патологической физиологии Башкирского медицинского университета свидетельствовали о значительном увеличении содержания ряда из них в печени при внутрижелудочном пути интоксикации животных суспензией порошка руды [20, 50]. Исследования показали, что при интоксикации элементами медно-цинковой руды в печени происходит постепенное снижение содержание восстановленного глутатио-

на. К завершению 2-го месяца эксперимента его уровень снижался до 72,6%, а третьего месяца – до 67,9% от показателя животных контрольной группы. Изучение в печени содержания свободных сульфгидрильных групп, ферментов системы глутатиона – глутатионпероксидазы, глутатионтрансферазы, глутатионпероксидазы, γ -глутамилтранспептидазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы выявили однотипную направленность динамики изменений – постепенное снижение активности по мере удлинения интоксикации животных. При определении уровня основных антиоксидантных витаминов, метаболически связанных с системой глутатиона, и активности ферментов антиоксидантной защиты СОД и каталазы в печени также было установлено статистически значимое снижение у животных опытной группы.

Таким образом, резюмируя изложенное, следует отметить, что изменения в системе глутатиона в костной ткани и ткани печени, вызванные действием элементов, содержащихся в медно-цинковой колчеданной руде, имеют общие закономерности, а отличительные особенности связаны с наличием в костной ткани значительной массы минерального вещества и, вероятно, различной буферной емкостью защитных систем. На молекулярном уровне изменения носят односторонний характер. Это, вероятно, связано с основной биологической функцией глутатиона, которая реализуется поддержанием системы GSH-GS-SG, защитой сульфгидрильных групп белков S-глутатионированием, активностью глутатионзависимых ферментов и конъюгацией различных эндогенных метаболитов и ксенобиотиков [11, 32, 38, 127, 136].

Однако совершенно очевидно также, что особое значение при этом имеют и особенности метаболизма костной ткани, в частности течение процессов ремоделирования с участием остеокластов и остеобластов, характер регуляции остеокластогенеза и остеобластогенеза системными гормонами и «коротко дистантными», локальными тканевыми факторами [20, 33], роль костной ткани в поддержании минерального гомеостаза и др. Нарушение системы глутатиона в изменениях метаболизма, приводящих к снижению костной прочности при длительном действии элементов, содержащихся в медно-цинковой колчеданной руде, в патогенетиче-

ских механизмах развития остеопении и остеопороза, как показывают результаты проведенных нами исследований и анализ данных литературы играют ведущую роль (Рисунок 37).

В действии тяжелых металлов и токсичных элементов руды на костную ткань на фоне связывании сульфгидрильных групп биомолекул и замещения катионов кальция в наноструктуре гидроксиапатита важнейшее значение имеет активация свободнорадикальных процессов и развивающийся дефицит антиоксидантной защиты.

В этой связи представлял интерес изучение влияния на метаболизм костной ткани при действии компонентов полиметаллической руды антиоксидантных препаратов, способствующих повышению антиоксидантной защиты и препятствующих истощению ее физиологических ресурсов. Для этих целей был использован антиоксидантный препарат (комплекс витаминов с микроэлементом), содержащий в своем составе α -токоферол, β -каротин, аскорбиновую кислоту, селен и комплекс витаминов группы В в виде сухих дрожжей. Выбор данного антиоксидантного препарата для экспериментов был связан не только с тем, что при действии элементов медно-цинковой руды в тканях печени и костей снижается уровень α -токоферола и аскорбиновой кислоты, но наличием в его составе селена - важнейшего элемента, входящего в состав глутатионпероксидазы в качестве кофактора, и тиоредоксинредуктазы. При дефиците селена происходит усиленное накопление кадмия, ртути и мышьяка. Он является антагонистом Hg, Cd, Pb, As, Ta, Au [71, 162].

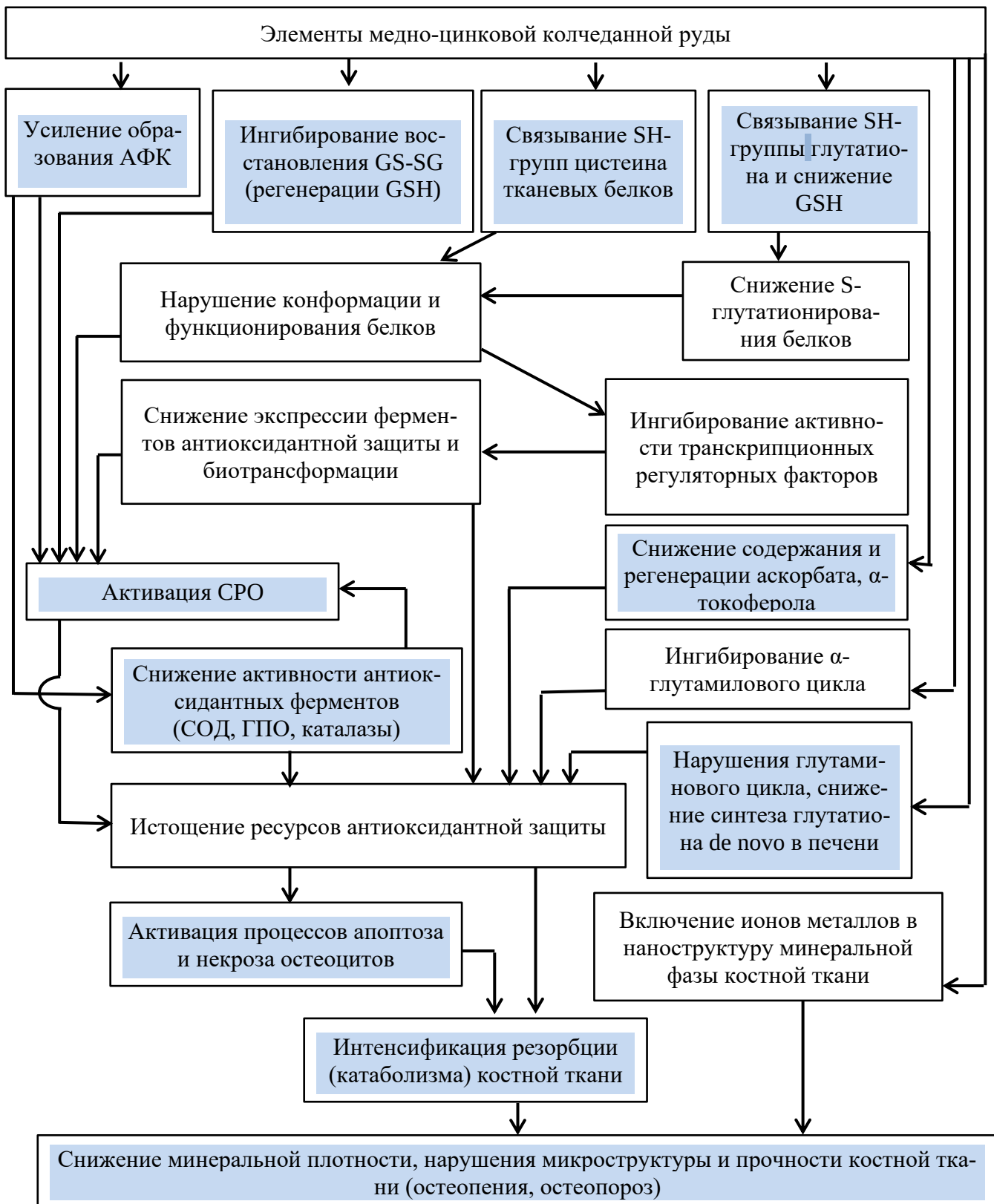


Рисунок 37 – Нарушения системы глутатиона в костной ткани в патогенетических механизмах развития остеопении и остеопороза при действии элементов, содержащихся в медно-цинковой колчеданной руде. АФК – активные формы кислорода, GSH – восстановленный глутатион, GS-SG – окисленный глутатион, СРО – свободно-радикальное окисление, СОД – супероксиддисмутаза, ГПО – глутатионпероксидаза (закрашенные показатели, изученные в наших исследованиях)

Проведённые исследования показали, что ежедневное введение комплекса витаминов с микроэлементом из расчёта 50 мг/кг массы крысы в течение третьего месяца интоксикации суспензией порошка полиметаллической руды вызывает улучшение глутатионовой системы в костной ткани статистически значимо по сравнению с животными, не получавшими витаминный препарат, повышает уровень GSH, свободных сульфгидрильных групп белков, а также активность глутатионпероксидазы и γ -глутамилтранспептидазы, а активность глутатионтрансферазы, глутатионредуктазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы восстанавливает до уровня животных контрольной группы. Одновременно использование витаминного антиоксидантного препарата на фоне воздействия элементов медно-цинковой колчеданной руды способствует увеличению в костной ткани содержания аскорбиновой кислоты, α -токоферола, активности супероксиддисмутазы и каталазы, также достигающие уровня контрольных значений. В костной ткани у животных основной группы, получавших комплекс витаминов с микроэлементом снижается содержание первичных и вторичных продуктов ПОЛ, отражая ингибирование интенсивности свободнорадикальных процессов.

Таким образом, использование антиоксидантного витаминного препарата при длительном поступлении компонентов медно-цинковой колчеданной руды, включающей тяжёлые металлы и другие токсичные элементы, способствовало улучшению системы глутатиона, повышало уровень других компонентов антиоксидантной защиты, снижало интенсивность липопероксидации. Важно, что на фоне изменений состояния оксидантно-антиоксидантной системы в костной ткани при введении витаминного препарата наблюдались улучшение метаболизма с ингибированием процессов катаболизма коллагена и выравниванием дисбаланса ремоделирования. Эти метаболические сдвиги проявлялись снижением содержания в плазме крови свободного оксипролина, С-концевых телопептидов коллагена типа I и улучшением показателей минерального обмена.

Положительный эффект при введении витаминного препарата был установлен и при определении компонентов системы глутатиона в печени экспериментальных животных. У крыс, получавших комплекс витаминов с микроэлементом

на фоне интоксикации суспензией порошка руды, повышался уровень GSH, свободных сульфгидрильных групп белков, активность ферментов глутатионного цикла. Содержание в печени этой группы крыс α -токоферола, аскорбиновой кислоты, активность СОД и каталазы, общая антиокислительная активность существенно не отличались от показателей контрольной группы. Эти данные со всей очевидностью позволяют предполагать об улучшении метаболических процессов в печени с повышением интенсивности глутамилового цикла, синтезом глутатиона и поступлением его в периферические ткани.

Полученные результаты, с одной стороны, еще раз подчеркивают значимую роль активации свободнорадикальных процессов в возникновении метаболических нарушений и структурных изменений в костной ткани, в механизмах развития остеопении и остеопороза при действии элементов, содержащихся в медно-цинковой руде, а, с другой, возможность эффективного использования в профилактике развития остеопенического синдрома на фоне длительного контакта с компонентами рудничной пыли в производственных условиях добычи и обогащения полиметаллических руд антиоксидантных витаминных препаратов.

В заключении необходимо отметить, что результат проведенных исследований и анализ данных литературы позволяют выделить при длительном поступлении в организм компонентов медно-цинковой колчеданной руды даже в низких концентрациях ряд ведущих параллельно действующих патогенетических механизмов остеотоксического действия: 1) взаимодействие со свободными сульфгидрильными и другими группами биомолекул с изменением конформации, структуры и функционирования; 2) активация процессов свободнорадикального окисления за счет образования активных форм кислорода под действием металлов переменной валентности (Fe, Cu, Mn, Cr, Pb и других); 3) истощение резервов и снижение ресурсов системы глутатиона и других физиологических механизмов антиоксидантной защиты ткани; 4) изменение нанокристаллической структуры гидроксиапатита минеральной фазы кости в результате замещения кальция остеотропными элементами, содержащимися в руде.

Выводы

1. Комплекс элементов медно-цинковой колчеданной руды при длительном поступлении в организм приводит к нарушению в костной ткани системы глутатиона: снижению уровня и регенерации восстановленного глутатиона, падению содержания свободных сульфгидрильных групп белков, ингибированию активности глутатионзависимых ферментов - глутатионпероксидазы, глутатионтрансферазы, γ -глутамилтранспептидазы.

2. Нарушения системы глутатиона в костной ткани при интоксикации элементами руды цветных металлов негативно отражается на уровне других компонентов неферментативного (α -токоферол, аскорбиновая кислота) и ферментативного звеньев (активность супероксиддисмутазы и каталазы) антиоксидантной защиты.

3. Хроническое действие природного комплекса тяжёлых металлов и других токсичных элементов медно-цинковой колчеданной руды приводит к повышению тканевого распада коллагена, нарушению координированного течения процессов ремоделирования костной ткани с превалированием остеорезорбции, активации в костной ткани перекисного окисления липидов, с увеличением уровня первичных и вторичных продуктов липопероксидации.

4. Компоненты полиметаллической руды при длительном поступлении даже в низких дозах приводят к выраженным нарушениям функционирования системы глутатиона (снижение содержания восстановленного глутатиона, свободных сульфгидрильных групп белков, активности глутатионпероксидазы, глутатионтрансферазы, глутатионредуктазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, γ -глутамилтранспептидазы), уровня других компонентов антиокислительной защиты (аскорбиновая кислота, α -токоферол, супероксиддисмутаза, каталаза) в печени, что сопровождается снижением содержания восстановленного глутатиона в плазме крови.

5. Хроническая интоксикация комплексом элементов медно-цинковой колчеданной руды вызывает нарушения ультраструктуры и микроархитектоники костной ткани, снижается суммарная площадь и поперечный размер костных балок эпифизов, количество остеонов диафизов трубчатых костей. При электронно-микроскопическом и гистологическом исследовании обнаруживается деструкция внутриклеточных органелл остеоцитов и их разрушение, рассасывание и истончение костных пластинок, усиление резорбции с образованием многочисленных узуров, снижение костеобразования.

6. Применение антиоксидантного витаминного препарата на фоне хронической интоксикации элементами, содержащимися в медно-цинковой колчеданной руде оказывает выраженный профилактический эффект. При этом наблюдаются снижение содержания С-концевых телопептидов коллагена типа I и свободного оксипролина в плазме крови на фоне физиологической активности костной щелочной фосфатазы, характеризуя корреляцию процессов резорбции и остеогенеза, ингибирование перекисного окисления липидов костной ткани, улучшение показателей системы глутатиона и антиокислительной защиты в костной ткани и печени.

7. Снижение уровня восстановленного глутатиона с дискоординацией функционирования системы глутатиона и усиление свободнорадикального окисления в костной ткани, играют ведущую роль в механизмах остеотоксического действия комплекса элементов, содержащихся в медно-цинковой колчеданной руде.

Список сокращений и условных обозначений

- ARE – антиоксидант-респонсивный элемент
- ГВ – глутатион восстановленный
- ГГТ - гамма-глутамилтранспептидаза
- ГПО – глутатионпероксидаза
- ГР – глутатионредуктаза
- ГТ – глутатионтрансфераза
- Г-6-фДГ - глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа
- ДК – диеновые конъюгаты
- КД – кетодиены
- КЩФ – костная щелочная фосфатаза
- НАД⁺ - никотинамидадениндинуклеотид
- НАДН – никотинамидадениндинуклеотид восстановленный
- НАДФ⁺ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат
- НАДФН – никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный
- ОАА – общая антиокислительная активность
- ПОЛ – перекисное окисление липидов
- СОД – супероксиддисмутаза
- ССГ – свободные сульфгидрильные группы белков
- СТ – сопряженные триены
- ТБК – тиобарбитуровая кислота
- ТБК-АП – продукты, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой
- ЩФ – щелочная фосфатаза
- AP-1 (AP-2) – семейство белка-активатора-1 (белка-активатора-2), фактор транскрипции, включающий в себя c-Jun, c-Fos, ATF и JDP
- ДМТ – транспортер двухвалентных ионов
- СТх - С-концевые телопептиды коллагена типа I
- GR – глутатионредуктаза

Grx – глутаредоксин

GS-SG – окисленная форма глутатиона

GSHPx - глутатионпероксидаза

GST - глутатионтрансфераза

NF-kB – семейство ядерных факторов (факторов транскрипции) каппа В

Nrf-2 - факторы транскрипции

Список литературы

1. Аврунин, А.С. Иерархически организованная модель взаимосвязи клеточных и тканевых механизмов обмена кальция между костью и кровью / А.С. Аврунин, Л.К. Паршин // Морфология. – 2013. – Т. 143, № 1. – С. 76–84.
2. Активная защита при окислительном стрессе. Антиоксидант-респонсивный элемент (обзор) / В.В. Ляхович, В.А. Вавилин, Н.К. Зенков, Е.Б. Меньщикова // Биохимия. – 2006. – Т. 71, № 9. – С. 1183–1198.
3. Активность глутатионредуктазы при патологических состояниях печени и очистка фермента с применением ионообменной хроматографии для исследования каталитических свойств / А.А. Агарков, С.С. Попов, Е.Д. Крыльский [и др.] // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2017. – Т. 17, № 1. – С. 168–175.
4. Активность и каталитические свойства глутатионпероксидазы при токсическом поражении печени / К.К. Шульгин, С.С. Попов, А.Н. Верёвкин, Т.Н. Попов, А.В. Семенихина // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2020. – Т. 20, № 1. – С. 100-108.
5. Антиоксидантная система как перспективное направление в оценке состояния и прогнозировании здоровья населения / Р.С. Рахманов, Т.В. Блинова, А.В. Тарасов, Д.С. Шумских // Гигиена и санитария. – 2014. – Т. 93, № 6. – С. 91–94.
6. Арутюнян, А.В. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма / А.В. Арутюнян, Е.Е. Дубинина, Н.Н. Зыбина. – СПб., 2000. – 110 с.
7. Асатиани, В.С. Ферментные методы анализа / В.С. Асатиани. – М.: Наука, 1969. – 740 с.
8. Аскарова, З.Ф. Профессиональный риск для здоровья работников горнодобывающих предприятий / З.Ф. Аскарова, В.П. Чащин, Э.И. Денисов. - СПб., 2010. - 244 с.

9. Ахполова, В.О. Современные представления о кинетике и патогенезе токсического воздействия тяжелых металлов (обзор литературы) / В.О. Ахполова, В.Б. Брин // Вестник новых медицинских технологий. - 2020. - Т. 27, № 1. - С. 55-61.
10. Бакиров, А.Б. Опыт оценки риска здоровью населения горно-рудных территорий, обусловленного водным фактором / А.Б. Бакиров, Р.А. Сулейманов, Т.К. Валеев // Медицина труда и экология человека. – 2016. - № 2. – С. 5-13.
11. Биологическая роль глутатиона / О.А. Борисинок, М.И. Бушма, О.Н. Басалай, А.Ю. Радковец // Медицинские новости. – 2019. - № 7 (298). – С. 3-8.
12. Биохимические методы анализа показателей обмена биополимеров соединительной ткани: методические рекомендации / П.Н. Шараев, В.Н. Пишков, О.Н. Зубарев [и др.]. – Ижевск, 1990. – 22 с.
13. Биохимические показатели крови у животных различного возраста при отравлении тяжелыми металлами / Р.Р. Тухватшин, З.М. Аумолдаева, Т.С. Абаева, А.А. Исупова // Universum: медицина и фармакология. – 2017. – № 1 (35). – С. 15–20.
14. Білецька, Е.М. Порівняльна оцінка біопротекторної дії цинку в органічній та неорганічній формі на остеотропність свинцю в експериментальних умовах / Е.М. Білецька, Н.М. Онул, В.В. Калінічева // Медичні перспективи. – 2016. – Т. XXI, № 4. – С. 123-129.
15. Брин, В.Б. Влияние молибденовой и свинцовой интоксикации на обмен кальция у крыс в условиях экспериментальной гипо- и гиперкальциемии / В.Б. Брин, Э.Р. Меликова, В.О. Ахполова // Кубанский научный медицинский вестник. – 2016. – № 3 (158). – С. 28–33.
16. Влияние алюминия, цинка и меди на активность супероксиддисмутазы эритроцитов больных на гемодиализе / Д.Н. Паскалев, П.И. Чанкова, Б.Ц. Галунска [и др.] // Нефрология. – 2002. – Т. 6, № 4. – С. 44–48.
17. Влияние глюкокортикоидного антагониста на карбонилирование белков в печени крыс при ежедневных однократных иммобилизациях / В.Э. Цейлик-

ман, В.Е. Рябинин, О.Б. Цейликман [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Т. 156, № 7. – С. 38–40.

18. Влияние дикарбониллов на кинетические характеристики глутатионпероксидазы / В.З. Ланкин, К.Б. Шумаев, А.К. Тихазе, Б.И. Курганов // Доклады академии наук. – 2017. – Т. 475, № 6. – С. 706–709.

19. Влияние полиметаллической пыли медно*цинковых колчеданных руд на состояние минерального обмена и костной ткани / Э.Ф. Аглетдинов, Н.В. Нургалеев, Е.Р. Фаршатова [и др.] // Вестник Оренбургского государственного университета. - 2011. - № 15 (134). - С. 15-18.

20. Влияние элементов медно-цинковых колчеданных руд на ремоделирование костной ткани и факторы его регуляции / Е.Р. Фаршатова, Т.И. Ганеев, И.А. Меньшикова [и др.] // Казанский медицинский журнал. – 2015. – Т. 96, № 5. – С. 783–787.

21. Гаврилова, А.Р. Определение активности глутатионпероксидазы эритроцитов при насыщенных концентрациях субстрата / А.Р. Гаврилова, Н.Ф. Хмара // Лабораторное дело. – 1986. – № 12.1. – С. 724–727.

22. Гистологическая структура трубчатой кости у белых крыс при действии компонентов медно-цинковых колчеданных руд / Н.В. Нургалеев, Э.Ф. Аглетдинов, Е.Р. Фаршатова [и др.] // Медицинский вестник Башкортостана. – 2013. – Т. 8, № 1. – С. 89–92.

23. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. – М.: Практика, 1998. – 459 с.

24. Глутатион-зависимые механизмы антиоксидантной защиты при алкоголизме / Е.С. Ефременко, О.Ю. Жукова, Д.С. Титов [и др.] // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2019. - №4. – С. 105-108.

25. Глутатионовый голод клеток: последствия и коррекция / М.И. Борисенко, М.И. Бушма, О.Н. Басалай, А.Ю. Радковец // Медицинские новости. – 2019. - № 11 (302). – С. 10-15.

26. Глушков, С.И. Система глутатиона как естественная цитопротекторная система в условиях острых интоксикаций / С.И. Глушков, С.А. Куценко //

Медико-биологические проблемы противолучевой и противохимической защиты. – СПб.: Фолиант, 2004. – С. 67–68.

27. Директива Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010г. о защите животных, использующихся для научных целях.

28. Дубинина, Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение): физиологические и клинико-биохимические аспекты / Е.Е. Дубинина. – СПб., 2006. – 400 с.

29. Дыдыкина, И.С. От знаний о структуре костной ткани к выбору средств влияния на нее / И.С. Дыдыкина, П.С. Дыдыкина, А.В. Наумов // Русский медицинский журнал. – 2015. – Т. 23, № 7. – С. 388–390.

30. Зиякаева, К.Р. Токсическое действие медно-цинковой колчеданной руды на эритропоэз в условиях хронического эксперимента / К.Р. Зиякаева, А.Ф. Каюмова // Сибирский научный медицинский журнал. - 2020. - Т. 40, № 6. - С. 70-79.

31. Ихалайнен, Е.С. Химический состав клеточной ткани мышечков бедренной кости в компактном и губчатом веществах / Е.С. Ихалайнен, А.А. Семенов // Известия Российской военно-медицинской академии. – 2018. – Т. 37, № 1. – С. 262–264.

32. Калинина, Е.В. Роль глутатиона, глутатионтрансферазы и глутаредоксина в регуляции редокс-зависимых процессов / Е.В. Калинина, Н.Н. Чернов, М.Д. Новичкова // Успехи биологической химии. – 2014. – Т. 54. – С. 299–384.

33. Камилов, Ф.Х. Клеточно-молекулярные механизмы ремоделирования костной ткани и ее регуляция / Ф.Х. Камилов, Е.Р. Фаршатова, Д.А. Еникеев // Фундаментальные исследования. – 2014. – Т. 7, № 4. – С. 836–842.

34. Карпищенко, А.И. Глутатион-зависимая анти-оксидантная система в некоторых тканях крыс в условиях острого отравления дихлорэтаном / А.И. Карпищенко, С.И. Глушков, В.В. Смирнов // Токсикологический вестник. – 1997. – № 3. – С. 17–27.

35. Корчина, Т.Я. Анализ глутатионового звена антиоксидантной системы защиты у мужчин северного региона с различным уровнем антропогенной нагрузки / Т.Я. Корчина, В.И. Корчин // Технологии живых систем. – 2019. – Т. 16, № 3. – С. 47-55.
36. Кудашева, А.Р. Проблема остеопении среди работников горнодобывающего предприятия / А.Р. Кудашева, Р.Р. Якупов // Медицина труда и промышленная экология. – 2011. – № 8. – С. 27–29.
37. Кулинский, В.И. Система глутатиона. 1. Другие ферменты, тиол-дисульфидный обмен, воспаление и иммунитет, функции / В.И. Кулинский, Л.С. Колесниченко // Биомедицинская химия. – 2009. – Т. 55, № 4. – С. 365–379.
38. Кулинский, В.И. Система глутатиона. 1. Синтез, транспорт, глутатионтрансферазы, глутатионпероксидазы. / В.И. Кулинский, Л.С. Колесниченко // Биомедицинская химия. – 2009. – Т. 55, №3. – С. 255–277.
39. Метод определения активности каталазы / М.А. Королук, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова, В.Е. Токарев // Лабораторное дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.
40. Микроэлементозы человека: этиология, классификация, органопатология / А.П. Авцын, А.А. Жаворонков, М.А. Риш, Л.С. Строчкова. – М.: Медицина, 1991. – 496 с.
41. Мицуля, Т.П. Оценка воздействия этилметилгидроксипиридина сукцината на показатели обмена глутатиона при моделировании алкогольной зависимости / Т.П. Мицуля, Д.И. Мороз, К.Н. Диденко // Международный журнал экспериментального образования. – 2016. – № 7. – С. 55–58.
42. Накоскин, А.Н. Изменение биохимического состава бедренной кости у людей разного возраста / А.Н. Накоскин // Проблемы старения и долголетия. – 2008. – Т. 17, № 1. – С. 21–28.
43. Наурузов, Р.Р. Влияние тяжёлых металлов на организм человека / Р.Р. Наурузов // Новейшие достижения в науке и образовании: сборник научных трудов по материалам II Международной научно-практической конференции. – М., 2020. – С. 5-7.

44. Некоторые показатели микроэлементного и антиоксидантного статуса крыс при хромовой интоксикации / И.В. Михайлова, Л.А. Чеснокова, Н.В. Шаропова [и др.] // Гигиена и санитария. – 2014. – Т. 93, № 3. – С. 71–74.
45. Новые данные о диагностических возможностях цитозольных глутатион-S-трансфераз / С.А. Колесов, Р.С. Рахманов, Т.В. Блинова, Л.А. Страхова // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. – № 3. – С. 577–579.
46. Оберлиз, Д. Биологическая роль макро- и микроэлементов у человека и животных / Д. Оберлиз, Б.Ф. Харланд, А.В. Скальный. – СПб.: Наука, 2008. – 544 с.
47. Окислительный стресс: патологические состояния и заболевания / Е.Б. Меньщикова, Н.К. Зенков, В.З. Ланкин [и др.]. – Новосибирск, 2008. – 284 с.
48. Омеляненко, Н.П. Соединительная ткань (гистофизиология и биохимия): в 2 т. / Н.П. Омеляненко, Л.И. Слуцкий; под ред. акад. РАН С.П. Миронова. – М.: Изд-во «Известия», 2010. – Т. II. – 600 с.
49. Особенности обмена костной ткани при хронической интоксикации элементами, содержащимися в медно-цинковых колчеданных рудах / Ф.Х. Камилов, Е.Р. Фаршатова, Н.В. Нургалеев [и др.] // Медицинская наука и образование Урала. – 2013. – Т. 14, № 1 (73). – С. 76–79.
50. Остеопороз: влияние химических факторов производственной среды на метаболизм костной ткани: монография / Ф.Х. Камилов, Е.Р. Фаршатова, И.А. Меньщикова [и др.]. – Уфа: Мир печати, 2015. – 311 с.
51. Остеопороз: диагностика, профилактика и лечение / под ред. проф. О.М. Лесняк, проф. Л.И. Беневоленской. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: ГЭОТАР – Медиа, 2010. – 270 с.
52. Оценка антиокислительной активности плазмы крови с применением желточных липопротеидов / Г.И. Клебанов, И.В. Бабенкова, Ю.О. Теселкин [и др.] // Лабораторное дело. – 1988. – № 5. – С. 59–62.
53. Основные результаты токсикологических экспериментов «ин виво» с некоторыми металлическими и металло-оксидными наночастицами / Б.А. Кац-

нельсон, Л.И. Привалова, М.П. Сутункова и др. // Токсикологический вестник. – 2015. – №3 (132). – С. 26-39.

54. Оценка риска развития заболеваний полости рта у работников горно-обогатительного комбината, занятых добычей и переработкой медно-цинковых руд / А.А. Трофимчук, М.Ф. Кабирова, О.А. Гуляева [и др.] // Уральский медицинский вестник. – 2018. – №4. – С. 24-27.

55. Пермяков, Е.А. Металлсвязывающие белки: структура, свойства, функции / Е.А. Пермяков / Е.А. Пермяков. – М., 2012. – 542 с.

56. Показатели антиоксидантной системы в отдалённый период после острого отравления цитратом ртути в эксперименте / Е.Г. Батоцыренова, О.А. Вакуненкова, Е.А. Золотоверхая [и др.] // Токсикологический вестник. – 2020. – № 2 (161). – С. 36-41.

57. Показатели системы глутатиона и ферменты холестаза при острой алкогольной интоксикации / Н.А. Терехина, Е.В. Жидко, Г.А. Терехин, А.Г. Орбиданс // Пермский медицинский журнал. – 2016. – Т. 33, № 4. – С. 73–77.

58. Променашева, Т.Е. Роль оксидативного стресса и системы глутатиона в патогенезе неалкогольной жировой болезни печени / Т.Е. Променашева, Л.С. Колесниченко, Н.М. Козлова // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2014. – № 5 (99). – С. 80–83.

59. Профессиональные риски нарушения здоровья работников занятых, добычей и переработкой полиметаллических руд / Л.К. Каримова, П.В. Серебряков, Э.Р. Шайхлисламова, И.В. Яцына; под ред. В.Н. Ракитского, А.Б. Бакирова. – М.; Уфа, 2016. – 337 с.

60. Рагино, Ю.И. Простой способ оценки концентрации витаминов Е и А в липопротеинах низкой плотности / Ю.И. Рагино, Е.В. Каштанова // Клиническая лабораторная диагностика. – 2002. – № 12. – С. 11–13.

61. Редокс-потенциал и показатели системы глутатиона эритроцитов пациентов с ишемической болезнью сердца и сахарным диабетом второго типа /

И.В. Буко, Н.Л. Цапаева, Е.Э. Константинова [и др.] // Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия медицинских наук. - 2013. - № 1. - С. 16-21.

62. Роль оксида азота в процессах свободно-радикального окисления. / А.Г. Соловьёва, В.Л. Кузнецова, С.П. Перетягин [и др.] // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2016. – № 1 (53). – С. 218-233.

63. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / под ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.

64. Сааркоппель, Л.М. Сравнительная оценка состояния здоровья рабочих горнорудной промышленности / Л.М. Сааркоппель // Медицина труда и промышленная экология. – 2007. – № 12. – С. 17–22.

65. Саркисов, Д.С. Микроскопическая техника: руководство для врачей и лаборантов / Д.С. Саркисов, Ю.Л. Перов. – М., 1996. – 544 с.

66. Система глутатиона в субклеточных фракциях головного мозга и печени растущих крыс / О.В. Галкина, А.А. Бахтюков, М.О. Ахметшин [и др.] // Нейрохимия. – 2017. – Т. 34, № 4. – С. 263–269.

67. Соотношение между липопероксидацией и окислительной модификацией белка в печени в динамике тридцатисуточной гипокинезии / Т.Г. Тимофеева, А.И. Синицкий, Т.А. Филимонова [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 2. – С. 143–146.

68. Сравнительная характеристика химического состава костной ткани мышечков бедренной кости в норме и при деформирующем артрозе / Е.С. Ихалайнен, И.В. Гайворонский, В.В. Хоминец [и др.] // Вестник российской военно-медицинской академии. – 2018. – № 2 (62). – С. 177–181.

69. Сульдина, Т.И. Содержание тяжелых металлов в продуктах и их влияние на организм / Т.И. Сульдина // Рациональное питание, пищевые добавки и биостимуляторы. - 2016. - № 1. - С. 136-140.

70. Тапбергенов, С.О. Глутатионовая редокс-система и ферменты антиоксидантной защиты при гипотиреозе и адреналэктомии / С.О. Тапбергенов, Б.С. Советов, Р.Б. Бекбосынова // Успехи современного естествознания. – 2015. – № 1–2. – С. 192–194

71. Токсикологическая химия. Метаболизм и анализ токсикантов: учебное пособие для вузов / Е.Ю. Афанасьева, Е.Я. Борисова, О.Л. Верстакова [и др.]; под ред. Н.И. Калетиной. – М.: ГЭОТАР, 2008. – 1016 с.

72. Тяжелые металлы как фактор возможных экологически обусловленных заболеваний в Астраханском регионе / В.С. Рыбкин, Н.А. Богданов, Ю.С. Чуйков, Г.А. Теплая // Гигиена и санитария. – 2014. – Т. 93, № 2. – С. 27–31.

73. Уикли, Б. Электронная микроскопия для начинающих / Б. Уикли. – М.: Мир, 1975. – 324 с.

74. Уровень системных и локальных факторов регуляции ремоделирования костной ткани при действии металлов, содержащихся в медно-цинковой колчеданной руде / Е.Р. Фаршатова, Г.В. Иванова, Д.А. Еникеев, Ф.Х. Камилов // Международный научно-исследовательский журнал. – 2015. – № 2–4 (33). – С. 64–66.

75. Уровень эссенциальных и токсичных элементов в биосредах полости рта у работников горно-обогатительного комбината, занятых добычей и переработкой медно-цинковых руд / А.А. Трофимчук, М.Ф. Кабирова, О.А. Гуляева [и др.] // Проблемы стоматологии. – 2018. – Т. 14, № 1. – С. 33–36.

76. Фаршатова, Е.Р. Влияние металлов, содержащихся в медно-цинковых колчеданных рудах на метаболизм костной ткани / Е.Р. Фаршатова, И.А. Меньшикова, Ф.Х. Камилов // Медицинский вестник Башкортостана. – 2014. – Т. 9, № 4. – С. 57–59.

77. Характеристика минерального обмена при действии компонентов медно-цинковых руд в эксперименте / Н.В. Нургалеев, Э.Ф. Аглетдинов, Е.Р. Фаршатова [и др.] // Здоровье человека XXI века: сборник научных статей IV-й российской научно-практической конференции. – Казань, 2012. – С. 829–834.

78. Шарманов, Т.Ш. Питание и здоровье в связи с экологией / Т.Ш. Шарманов // Вестник АМН СССР. — 1989. — № 8. — С. 27-30.

79. Шпагина, Л.Н. Формирование и особенности структуры заболеваемости шахтеров с профессиональной патологией периферической нервной и кост-

номышечной систем / Л.Н. Шпагина // Гигиена и санитария. – 2014. – Т. 93, № 3. – С. 37–39.

80. Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма / И.А. Волчегорский, И.И. Долгушин, О.Л. Колесников, В.Э. Цейликман. – Челябинск, 2000. – 167 с.

81. Экспериментальная апробация эффективности биопрофилактического комплекса, направленного на снижение токсических эффектов комбинированного действия свинца и кадмия / Л.И. Привалова, С.В. Клинова, И.А. Минигалеева и др. // Гигиена и санитария. – 2020. – Т. 99, №1. – С. 85–89.

82. 9-Norbornyl-6-chloropurine (NCP) induces cell death through GSH depletion-associated ER stress and mitochondrial dysfunction / P. Plačková, M. Šála, M. Šmídková [et al.] // Free Radic. Biol. Med. – 2016. – Vol. 97. – P. 223-235. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.06.004.

83. 9-Norbornyl-6-chloropurine is a novel antileukemic compound interacting with cellular GSH / P. Plačková, N. Rozumová, H. Hrebabecky [et al.] // Anticancer Res. – 2013. – Vol. 33, N 8. – P. 3163-8.

84. Absence of genotoxic impact assessed by micronuclear frequency in circulating lymphocytes of workers exposed to cadmium / D. Lison, G. Van Maele-Fabry, A. Vral [et al.] // Toxicol. Lett. – 2019. – Vol. 303. – P. 72-77.

85. Accumulation of heavy metals in rat's body under chronic combined intoxication with zinc, copper and arsenic salts / R.M. Tazitdinova, R.R. Beisonova, A.S. Kurmanbayeva, A.I. Grigoryev // Вестник Карагандинского университета. Серия: Биология. Медицина. География. – 2019. - № 1 (93). – С. 36-42.

86. Achete, D. Effects of Ginko biloba on diseases related to oxidative stress / D. Achete, D. Souza, S.V. De Marqui [et al.] // Planta Med. – 2020. – Vol. 86. – P. 376-386. <https://doi.org/10.1055/a-1109-3405>.

87. Administration of the Nrf2-ARE activators sulforaphane and carnosic acid attenuates 4-hydroxy-2-nonenal-induced mitochondrial dysfunction ex vivo / D.M. Miller, I.N. Singh, J.A. Wang, E.D. Hall // Free Radic. Biol. Med. – 2013. – Vol. 57. – P. 1-9. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.12.011.

88. Afifi, M. Toxicity of silver nanoparticles on the brain of *Oreochromis niloticus* and *Tilapia zillii* / M. Afifi, S. Saddick, O.A. Abu Zinada // Saudi J. Biol. Sci. – 2016. – Vol. 23, № 6. – P. 754-760.
89. Alkaladi, A. Vitamins E and C ameliorate the oxidative stresses induced by zinc oxide nanoparticles on liver and gills of *Oreochromis niloticus* / A. Alkaladi // Saudi J. Biol. Sci. – 2019. – Vol. 26, № 2. – P. 357-362. doi: 10.1016/j.sjbs.2018.07.001.
90. Analysis of the glutathione S-transferase genes polymorphisms in the risk and prognosis of renal cell carcinomas. Case-control and meta-analysis / A. Abid, S. Ajaz, A.R. Khan [et al.] // Urol. Oncol. – 2016. – Vol. 34, № 9. – P. 419. doi: 10.1016/j.urolonc.2016.04.005.
91. Antioxidant role of glutathione S-transferases: 4-Hydroxynonenal, a key molecule in stress-mediated signaling / S.S. Singhal, S.P. Singh, P. Singhal [et al.] // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 2015. – Vol. 289, № 3. – P. 361-70. doi: 10.1016/j.taap.2015.10.006.
92. Aquilano, K. Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant / K. Aquilano, S. Baldelli, M.R. Ciriolo // Front. Pharmacol. – 2014. - № 5. – P. 196. doi: 10.3389/fphar.2014.00196.
93. Ascorbate synthesis pathway. Dial role of ascorbare in bone homeostasis / K.H. Gabbay, K.M. Bohren, R. Morello [et al.] // J. Biol. Chem. – 2010. – Vol. 285. – P. 19510–19520. doi: 10.1074/jbc.M110.110247
94. Azeem, A.M.A. Studying the effect of gamma-irradiated pomegranate peels aqueous extract against lead toxicity in wistar rats / A.M.A. Azeem, A.M. Mounir // Pakistan J. Zool. – 2019. – Vol. 51, № 1. – P. 347-353. DOI: 10.17582/journal.pjz/2019.51.1.347-353
95. Bellomo, G. Modulation of cellular glutathione and protein thiol status during quinone metabolism / G. Bellomo, H. Thor, S. Orrenius // Methods Enzymol. – 1990. – Vol. 186. – P. 627-35.
96. Benthic macroalgae as biological indicators of heavy metal pollution in the marine environments: a biomonitoring approach for pollution assessment / S.

Chakraborty, T. Bhattacharya, G. Singh, J.P. Maity // *Ecotoxicol. Environ Saf.* – 2014. – Vol. 100. – P. 61-8. doi: 10.1016/j.ecoenv.2013.12.003.

97. Beutler, E. *Red cell metabolism a manual of biochemical methods* / E. Beutler. - Orlando, 1990. – P. 131-134.

98. Bibliometria overview of research trends on heavy metal health risks and impacts in 1989-2018 / R. Han, B. Zhou, Y. Huang [et al.] // *J. Clean. Product.* – 2020. – Vol. 276. – P. 123249. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.123249>

99. Biletska, E.M. Combined effect of low dose levels of lead and zinc on bone tissue of rats / E.M. Biletska, N.M. Onul, V.V. Kalinicheva // *Запорозький медичинський журнал.* – 2018. – Т. 20, № 1 (106). – С. 101–104.

100. Board, P.G. Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology / P.G. Board, D. Menon // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2013. – Vol. 1830, № 5. – P. 3267-88. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.11.019.

101. Braithwaite, E.K. Activation of metallothionein transcription by 4-hydroxynonenal / E.K. Braithwaite, M.D. Mattie, J.H. Freedman // *J. Biochem. Mol. Toxicol.* – 2010. – Vol. 24, N 5. – P. 330-4. doi: 10.1002/jbt.20342.

102. Cadmium down – regulates Apo lipoprotein E (Apo E) expression during malignant transformation of rat liver cells: direct evidence for DNA hypermethylation in the promoter region of Apo E / M. Hirao-Suzuki, S. Takeda, T. Kobayashi [et al.] // *J. Toxcol. Sci.* – 2018. – Vol. 43, № 9. – P. 537-543.

103. Cadmium, Organ Toxicity and Therapeutic Approaches: A Review on Brain, Kidney and Testis Damage / M. Rinaldi, A. Micali, H. Marini [et al.] // *Curr. Med. Chem.* – 2017. – Vol. 24, № 35. – P. 3879-3893. doi: 10.2174/0929867324666170801101448.

104. Causes and consequences of cysteine S-glutathionylation / C.L. Grek, J. Zhang, Y. Manevich [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2013. – Vol. 288, № 37. – P. 26497-504. doi: 10.1074/jbc.R113.461368.

105. Changes of lipid peroxidation and glutathione redox system, and expression of glutathione peroxidase regulatory genes as effect of short-term aflatoxin B1 ex-

posure in common carp / B. Kövesi, C. Pelyhe, E. Zándoki [et al.] // *Toxicol.* – 2018. – Vol. 144. – P. 103-108. doi: 10.1016/j.toxicol.2018.02.003.

106. Characterization of polysaccharides isolated from *Periploma angustifolia* and its antioxidant activity and renoprotective potential against cadmium induced toxicity in HEK293 cells and rat kidney / K. Athmouni, D. Belhaj, R. Chawech [et al.] // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2019. – Vol. 125. – P. 730-742. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.12.046.

107. Cheng, X. Regulation of the Nrf2 antioxidant pathway by microRNAs: New players in micromanaging redox homeostasis / X. Cheng, C.H. Ku, R.C. Siow // *Free Radic. Biol. Med.* – 2013. – Vol. 64. – P. 4-11. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.025.

108. Cinya, M.A. The role of some antioxidants on absorption, desorption and elimination of lead and iron. / M.A. Cinya, M.B. Idris, U.A. Zakariyya // *Eur. J. Biomed. Pharm. Sci.* – 2016. – № 3. – P. 528-531.

109. Coenzyme Q10 ameliorates cadmium induced reproductive toxicity in male rats / R. Saha, S. Roychoudhury, K. Kar [et al.] // *Physiol. Res.* – 2018. – Vol. 68. – P. 141-145. <https://doi.org/10.33549/physiolres.934000>

110. Copper exposure induces toxicity to the antioxidant system via the destruction of Nrf2/ARE signaling and caspase-3-regulated DNA damage in fish muscle: amelioration by myo-inositol / W.D. Jiang, Y. Liu, J. Jiang [et al.] // *Aquat. Toxicol.* – 2015. – Vol. 159. – P. 245-55. doi: 10.1016/j.aquatox.2014.12.020.

111. Copper-induced oxidative cleavage of glutathione transferase F1-1 from *Zea mays* / M.H. Alqarni, M.M. Muharram, S.M. Alshahrani, N.E. Labrou // *Intern. J. Biol. Macromol.* – 2019. – Vol. 128. – P. 493–498.

112. Counteraction of HCV-Induced Oxidative Stress Concurs to Establish Chronic Infection in Liver Cell Cultures / S. Anticoli, D. Amatore, P. Matarrese [et al.] // *Oxid Med. Cell Longev.* – 2019. – 2019. – P. 6452390. doi: 10.1155/2019/6452390.

113. Couto, N. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network / N. Couto, J. Wood // *Free Radical Biol. Med.* – 2016. – Vol. 95. – P. 27-42. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.028>.

114. Cullinan, S.B. Coordination of ER and oxidative stress signaling: the PERK/Nrf2 signaling pathway / S.B. Cullinan, J.A. Diehl // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2006. – Vol. 38, № 3. – P. 317-32.
115. Curcumin ameliorates cadmium-induced nephrotoxicity in Sprague-Dawley rats / K.S. Kim, H.J. Lim, J.S. Lim [et al.] // *Food Chem. Toxicol.* – 2018. – Vol. 114. – P. 34-40. doi: 10.1016/j.fct.2018.02.007.
116. Davison, A.J. Mechanism of the inhibition of catalase by ascorbate. Roles of active oxygen species, copper and semidehydroascorbate / A.J. Davison, A.J. Kettle, D.J. Fatur // *J. Biol. Chem.* – 1986. – Vol. 261, № 3. – P. 1193-200.
117. Decline in transcriptional activity of Nrf2 causes age-related loss of glutathione synthesis, which is reversible with lipoic acid / J.H. Suh, S.V. Shenvi, B.M. Dixon [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2004. – Vol. 101, № 10. – P. 3381-6.
118. Desai, I.D. Vitamin E analysis methods for animal tissues / I.D. Desai // *Methods Enzymol.* – 1984. – Vol. 105. – P. 138-47.
119. DNA mismatch repair protein Mlh1 is required for tetravalent chromium intermediate-induced DNA damage / T.P. Wakeman, A. Yang, N.S. Dalal [et al.] // *Oncotarget.* – 2017. – N 8 (48). – P. 83975-83985. doi: 10.18632/oncotarget.20150.
120. Do GST polymorphisms influence in the pathogenesis of diabetic nephropathy? / R.M. de Lima, L.R.B. Dos Anjos, T.B. Alves [et al.] // *Mol. Cell Endocrinol.* – 2018. – № 478. – P. 10-16. doi: 10.1016/j.mce.2018.07.001.
121. Dominko, K. Glutathionylation: a regulatory role of glutathione in physiological processes / K. Dominko, D. Dikić // *Arch. Hig. Rada Toxicol.* – 2018. – Vol. 69, №1. – P. 1–24.
122. Effect of humic acids on lead poisoning in bones on a subcellular level in mitochondria / J. Vaškova, L. Vaškova, P. Mudron [et al.] // *Environ. Sci. Poll. Res.* – 2020. – Vol. 27. – P. 40679-40689. doi.org/10.1007/s11356-020-10075-w
123. Effects of mixed subchronic lead acetate and cadmium chloride on bone metabolism in rats / G. Yuan, H. Lu, Z. Yin [et al.] // *Int. J. Clin. Exp. Med.* – 2014. – Vol. 7, № 5. – P. 1378-85.

124. Effects of Organic and Inorganic Forms of Manganese, Zinc, Copper, and Chromium on Bioavailability of These Minerals and Calcium in Late-Phase Laying Hens / E. Yenice, C. Mızrak, M. Gültekin [et al.] // *Biol. Trace Elem. Res.* – 2015. – Vol. 167, № 2. – P. 300-7. doi: 10.1007/s12011-015-0313-8.

125. Effects of thirty elements on bone metabolism / M. Dermience, G. Lognay, F. Mathieu, P. Goyens // *J. Trace Elem. Med. Biol.* – 2015. – Vol. 32. – P. 86-106. doi: 10.1016/j.jtemb.2015.06.005.

126. Elblehi, S.S. L- α -Phosphatidylcholine attenuates mercury-induced hepatorenal damage through suppressing oxidative stress and inflammation / S.S. Elblehi, M.H. Hafez, Y.S. El-Sayed // *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* – 2019. – Vol. 26, № 9. – P. 9333-9342. doi: 10.1007/s11356-019-04395-9.

127. Enzymatic glutaredoxin-dependent method to determine glutathione and protein S-glutathionylation using fluorescent eosin-glutathione / L. Coppo, F.T. Ogata, S.M. Santhosh [et al.] // *Anal. Biochem.* – 2019. – № 568. – P. 24-30. doi: 10.1016/j.ab.2018.12.021.

128. Erythropoietin Signaling in Macrophages Promotes Dying Cell Clearance and Immune Tolerance / B. Luo, W. Gan, Z. Liu [et al.] // *Immunity.* – 2016. – Vol. 44, N 2. – P. 287-302. doi: 10.1016/j.immuni.2016.01.002.

129. ESR Resolves the C Terminus Structure of the Ligand-free Human Glutathione S-Transferase A1-1 / M.J. Lawless, J.R. Pettersson, G.S. Rule [et al.] // *Biophys. J.* – 2018. – Vol. 114, № 3. – P. 592-601. doi: 10.1016/j.bpj.2017.12.016.

130. Evaluating toxicity of copper(II) oxide nanoparticles (CuO-NPs) through waterborne exposure to tilapia (*Oreochromis mossambicus*) by tissue accumulation, oxidative stress, histopathology, and genotoxicity / K. Shahzad, M.N. Khan, F. Jabeen [et al.] // *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* – 2018. – Vol. 25, № 16. – P. 15943-15953. doi: 10.1007/s11356-018-1813-9.

131. Evaluation of lipid damage related to pathological and physiological conditions / S.C. Garcia, D. Grotto, R.P. Bulcão [et al.] // *Drug Chem. Toxicol.* – 2013. – Vol. 36, N 3. – P. 306-12. doi: 10.3109/01480545.2012.720989.

132. Expression of macrophage migration inhibitory factor by osteoblastic cells: protection against cadmium toxicity / J. Lizotte, E. Abed, C. Signor [et al.] // *Toxicol. Lett.* – 2012. – Vol. 215, № 3. – P. 167-73. doi: 10.1016/j.toxlet.2012.10.006.
133. Fernandes, A.P. Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system / A.P. Fernandes, A. Holmgren // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2004. – Vol. 6, № 1. – P. 63-74.
134. Ferroptosis is Involved in Acetaminophen Induced Cell Death / T. Lőrincz, K. Jemnitz, T. Kardon [et al.] // *Pathol. Oncol. Res.* – 2015. – Vol. 21, № 4. – P. 1115-21. doi: 10.1007/s12253-015-9946-3.
135. Filomeni, G. Cell signalling and the glutathione redox system / G. Filomeni, G. Rotilio, M.R. Ciriolo // *Biochem. Pharmacol.* – 2002. – Vol. 64, № 5-6. – P. 1057-64.
136. Forman, H.J. An overview of mechanisms of redox signaling / H.J. Forman, F. Ursini, M. Maiorino // *J. Mol. Cell Cardiol.* – 2014. – Vol. 73. – P. 2-9. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.01.018.
137. Freeland-Graves, J.H. Global perspectives on trace element requirements / J.H. Freeland-Graves, N. Sanjeevi, J.J. Lee // *J. Trace Elem. Med. Biol.* – 2015. – Vol. 31. – P. 135-41. doi: 10.1016/j.jtemb.2014.04.006.
138. Global Deletion of Glutathione S-Transferase A4 Exacerbates Developmental Nonalcoholic Steatohepatitis / M. Ronis, K. Mercer, B. Engi [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 2017. – Vol. 187, № 2. – P. 418-430. doi: 10.1016/j.ajpath.2016.10.022.
139. Glutamate cysteine ligase catalysis: dependence on ATP and modifier subunit for regulation of tissue glutathione levels / Y. Chen, H.G. Shertzer, S.N. Schneider [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280, № 40. – P. 33766-74.
140. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases / N. Ballatori, S.M. Krance, S. Notenboom [et al.] // *Biol. Chem.* – 2009. – Vol. 390, № 3. – P. 191-214. doi: 10.1515/BC.2009.033.
141. Glutathione transferase P1-1 an enzyme useful in biomedicine and as biomarker in clinical practice and in environmental pollution / A. Bocedi, G. Cattani, G. Gambardella [et al.] // *Nutrients.* – 2019. – Vol. 11, № 8. – P. 1741-1766.

142. Glutathione-s-transferase: a potential role in antitumor therapy / S.C. Dong, H.H. Sra, X.Y. Xu [et al.] // *Drug Des. Developm. Ther.* – 2018. – Vol. 12. – P. 3535–3547.
143. Goloi, K. Circulatory heavy (cadmium, lead, mercury, and chromium) inversely correlate with plasma GST activity and GSH level in COPD patients and impair NOX/Nrf2/GCLC/GST signaling pathway in cultured monocytes / K. Goloi, P. Manana, T. Dey [et al.] // *Toxicol. Vitro.* – 2019. – Vol. 54. – P. 269-279.
144. Hansen, J.M. Compartmentation of Nrf-2 redox control: regulation of cytoplasmic activation by glutathione and DNA binding by thioredoxin-1 / J.M. Hansen, W.H. Watson, D.P. Jones // *Toxicol. Sci.* – 2004. – Vol. 82, № 1. – P. 308-17.
145. Hayes, J.D. Glutathione transferases / J.D. Hayes, J.U. Flanagan, I.R. Jowsey // *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2005. – Vol. 45. – P. 51-88.
146. Heavy metal lead exposure, osteoporotic-like phenotype in an animal model, and depression of Wnt signaling / E.E. Beier, J.R. Maher, T.J. Sheu [et al.] // *Environ. Health Perspect.* – 2013. – Vol. 121, № 1. – P. 97-104. doi: 10.1289/ehp.1205374.
147. Hepatocyte Hyperproliferation upon Liver-Specific Co-disruption of Thioredoxin-1, Thioredoxin Reductase-1, and Glutathione Reductase / J.R. Prigge, L. Coppo, S.S. Martin [et al.] // *Cell Rep.* – 2017. – Vol. 19, № 13. – P. 2771-2781. doi: 10.1016/j.celrep.2017.06.019.
148. Human selenium-containing single-chain variable fragment with glutathione peroxidase activity protects NIH3T3 fibroblast against oxidative damage / R. Huo, L. Yang, T.G. Zhang, J.Y. Wei // *Mol. Biol. (Mosk).* – 2017. – Vol. 51, № 3. – P. 483-489. doi: 10.7868/S0026898417030077.
149. Imbalance in the glutathione system in *Opisthorchis felinus* infected liver promotes hepatic fibrosis / E.A. Perina, V.V. Ivanov, A.G. Pershina [et al.] // *Acta Trop.* – 2019. – Vol. 192. – P. 41-48. doi: 10.1016/j.actatropica.2019.01.017.
150. Impaired enzymatic reactive aldehyde-detoxifying capacity and glutathione peroxidase activity in the aged human arterial tissue / D. Lapenna, G. Ciofani, G. Obletter [et al.] // *Exp. Gerontol.* – 2019. – Vol. 116. – P. 7-13. doi: 10.1016/j.exger.2018.11.013.

151. Increased extracellular and intracellular Ca^{2+} lead to adipocyte accumulation in bone marrow stromal cells by different mechanisms / R. Hashimoto, Y. Katoh, Y. Miyamoto [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2015. – Vol. 457, N 4. – P. 647-52. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.01.042.

152. Influence of sample matrix on the bioavailability of arsenic, cadmium and lead during co-contaminant exposure / C.J. Ollson, E. Smith, P. Herde, A.L. Juhasz // *Sci. Total Environ.* – 2017. – № 595. – P. 660-665. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.04.036.

153. Intestinal calcium transport and its regulation in thalassemia: interaction between calcium and iron metabolism / K. Lertsuwan, K. Wongdee, J. Teerapornpunitak, N. Charoenphandhu // *J. Physiol. Sci.* – 2018. – Vol. 68, № 3. – P. 221-232. doi: 10.1007/s12576-018-0600-1.

154. Joint toxicity of a multi-heavy metal mixture and chemoprevention in Sprague dawley rats / Y. Wang, Y. Tang, Zh. Li [et al.] // *Environ. Res. Publ. Health.* – 2020. – Vol. 17. – P. 1451. doi:10.3390/ijerph17041451

155. Khalid, M. Metal-induced oxidative stress: an evidence-based update of advantages and disadvantages / M. Khalid, S. Hassani, M. Abdollahi // *Curr. Opin. Toxicol.* – 2020. – Vol. 20-21. – P. 55-68. doi.org/10.1016/j.cotox.2020.05.006.

156. Kleniewska, P. Assessment of human 4-hydroxynonenal, 8-isoprostane concentrations and glutathione reductase activity after synbiotics administration / P. Kleniewska, R. Pawliczak // *Adv. Med. Sci.* – 2018. – Vol. 63, № 2. – P. 301-305. doi: 10.1016/j.advms.2018.04.003.

157. Kono, Y. Superoxide radical inhibits catalase / Y. Kono, I. Fridovich // *J. Biol. Chem.* – 1982. – Vol. 257, № 10. – P. 5751-4.

158. Kupraszewicz, E. Excessive ethanol consumption under exposure to lead intensifies disorders in bone metabolism: a study in a rat model / E. Kupraszewicz, M.M. Brzóska // *Chem. Biol. Interact.* – 2013. – Vol. 203, N 2. – P. 486-501. doi: 10.1016/j.cbi.2013.01.002.

159. Lead concentrations in cortical and trabecular bones in deceased smelter workers / L. Gerhardsson, A. Akantis, N.G. Lundström [et al.] // *J. Trace Elem. Med. Biol.* – 2005. – Vol. 19, № 2-3. – P. 209-15.

160. Lead organ and tissue toxicity: roles of mitigating agents (Part 1) / E. Adikwu, O. Deo, O.P. Geoffrey, D.A. Enimeya // *Brit. J. Pharmacol. Toxicol.* – 2013. – № 4. – P. 232–240.

161. Long chain lipid hydroperoxides increase the glutathione redox potential through glutathione peroxidase 4 / E.M. Corteselli, E. Gibbs-Flournoy, S.O. Simmons [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* – 2019. – Vol. 1863, № 5. – P. 950-959. doi: 10.1016/j.bbagen.2019.03.002.

162. Low selenium levels are associated with decreased bone mineral densities / K.-C. Park, Y. Kwok, Y. Lee [et al.] // *J. Trace Element. Med. Bid.* – 2020. – Vol. 61. – P. 126534.

163. Lu, S.C. Glutathione synthesis / S.C. Lu // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2013. – Vol. 1830, № 5. – P. 3143-53. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.09.008.

164. Manganese homeostasis in the nervous system / P. Chen, S. Chakraborty, S. Mukhopadhyay [et al.] // *J. Neurochem.* – 2015. – Vol. 134, № 4. – P. 601-10. doi: 10.1111/jnc.13170.

165. MicroRNA-mediated regulation of glutathione and methionine metabolism and its relevance for liver disease / S.C. Lu, J.M. Mato, C. Espinosa-Diez, S. Lamas // *Free Radic. Biol. Med.* – 2016. – Vol. 100. – P. 66-72. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.03.021.

166. Minch, D.M. A review of dietary (phyto)nutrients for glutathione support / D.M. Minch, B.I. Brown // *Nutrients.* – 2019. – Vol. 11. – P. 1-20. <https://doi.org/10.3390/nu11092073>.

167. Mitochondrial glutathione peroxidase 4 disruption causes male infertility / M. Schneider, H. Förster, A. Boersma [et al.] // *Faseb J.* – 2009. – Vol. 23, № 9. – P. 3233-42. doi: 10.1096/fj.09-132795.

168. Molecular and Cellular Bases of Iron Metabolism in Humans / I.V. Milto, I.V. Suhodolo, V.D. Prokopieva, T.K. Klimenteva // *Biochemistry (Mosc)*. – 2016. – Vol. 81, № 6. – P. 549-64. doi: 10.1134/S0006297916060018.

169. Molecular basis for the dual subcellular distribution of microsomal glutathione transferase 1 / M. Shimoji, R.A. Figueroa, E. Neve [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* – 2017. – Vol. 1859, № 2. – P. 238-244. doi: 10.1016/j.bbamem.2016.11.014.

170. Mostafa, M.E. Dimethylfumarate ameliorates hepatic injury and fibrosis induced by carbon tetrachloride / M.E. Mostafa, A.A. Shaaban, H.A. Salem // *Chem. Biol. Interact.* – 2019. – Vol. 302. – P. 53-60. doi: 10.1016/j.cbi.2019.01.029.

171. Noor, A.A. Protective effects of Co-Q10, Ginkyo biloba, and L-carnitine on brain, kidney, liver, and endocrine system against sub-acute heavy metals toxicity in male rats / A.A. Noor, A.J. Ausama, S.G.A. Muhsin // *Toxicol. Environ. Health Sci.* – 2020. – Vol. 12. – P. 331-341.

172. Nordlund, P. Ribonucleotide reductases / P. Nordlund, P. Reichard // *Annu Rev. Biochem.* – 2006. – Vol. 75. – P. 681-706.

173. Omaye, S.T. Selected methods for the determination of ascorbic acid in animal cells, tissues, and fluids / S.T. Omaye, J.D. Turnbull, H.E. Sauberlich // *Methods Enzymol.* – 1979. – Vol. 62. – P. 3-11.

174. Orlowski, M. Isolation of gamma-glutamyl transpeptidase from dog kidney / M. Orlowski, A. Meister // *J. Biol. Chem.* – 1965. – Vol. 24. – P. 338-47.

175. Over-expression of chickpea glutaredoxin (CaCrx) provides tolerance to heavy metals by reducing metal accumulation and improved physiological and antioxidant defense system / A. Kumar, D.A. Kumar, V. Kumar [et al.] // *Ecotoxicol. Environ. Safety.* – 2020. – Vol. 192. – P. 110252. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110252>.

176. Patel, T.A. Antigenotoxic effect of melatonin against mercuric chloride in human peripheral blood lymphocytes / T.A. Patel, M.V. Rao // *Toxicol. Health.* – 2018. – Vol. 34, № 11. – P. 778-786.

177. Pathophysiological relevance of aldehydic protein modifications / N. Zarkovic, A. Cipak, M. Jaganjac [et al.] // *J. Proteomics*. – 2013. – Vol. 92. – P. 239-47. doi: 10.1016/j.jprot.2013.02.004.

178. Peterson, G.L. Simplification of protein assay method of Lowry et al. – which is more generally applicable / G.L. Peterson // *Anal. Biochem.* – 1997. – Vol. 83, № 2. – P. 346-356.

179. Physiologically-based pharmacokinetic modeling suggests similar bioavailability of Mn from diet and drinking water / G. Song, C.B. Van Landingham, P.R. Gentry [et al.] // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2018. – № 359. – P. 70-81. doi: 10.1016/j.taap.2018.09.023.

180. Pigeolet, E. Susceptibility of glutathione peroxidase to proteolysis after oxidative alteration by peroxides and hydroxyl radicals / E. Pigeolet, J. Remacle // *Free Radic. Biol. Med.* – 1991. – Vol. 11, № 2. – P. 191-5.

181. Plasma cysteine/cystine and glutathione/glutathione disulfide redox potentials in HIV and COPD patients / W.H. Watson, J.D. Ritzenthaler, P. Peyrani [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2019. – Vol. 143. * P. 55-61. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.07.031.

182. Pokusa, M. The Central Role of Biometals Maintains Oxidative Balance in the Context of Metabolic and Neurodegenerative Disorders / M. Pokusa, A. Kráľová Trančíková // *Oxid. Med. Cell Longev.* – 2017. – 2017. – P. 8210734. doi: 10.1155/2017/8210734.

183. Poole, L.B. Protein sulfenic acids in redox signaling / L.B. Poole, P.A. Karplus, A. Claiborne // *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2004. – Vol. 44. – P. 325-47.

184. Posttranslational modification and regulation of glutamate-cysteine ligase by the α,β -unsaturated aldehyde 4-hydroxy-2-nonenal / D.S. Backos, K.S. Fritz, J.R. Roede [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2011. – Vol. 50, № 1. – P. 14-26. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.10.694.

185. Rahimzadeh, M.R. Cadmium toxicity and treatment: An update / M.R. Rahimzadeh, M.R. Rahimzadeh, S. Kazemi // *Caspian J. Int. Med.* – 2017. – Vol. 8, № 3. – P. 135-145.

186. Reaction of bovine-liver copper-zinc superoxide dismutase with hydrogen peroxide. Evidence for reaction with H₂O₂ and HO₂⁻ leading to loss of copper / S.L. Jewett, S. Cushing, F. Gillespie [et al.] // *Eur. J. Biochem.* – 1989. – Vol. 180, № 3. – P. 569-75.

187. Role of glutathione peroxidase 1 in glucose and lipid metabolism-related diseases / J.Q. Huang, J.C. Zhou, Y.Y. Wu [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2018. – Vol. 127. – P. 108-115. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.05.077.

188. Role of Glutathione S Transferase M1 and T1 Gene Polymorphism in Hepatitis B Related Liver Diseases and Cryptogenic Cirrhosis / S. Kapahtia, R.K. Hazam, M. Asim [et al.] // *J. Clin. Exp. Hepatol.* – 2018. – Vol. 8, № 2. – P. 169-172. doi: 10.1016/j.jceh.2017.05.208.

189. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism / A. Loboda, M. Damulewicz, E. Pyza [et al.] // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2016. – Vol. 73. – P. 3221-3247.

190. Rooney, J.P. The role of thiols, dithiols, nutritional factors and interacting ligands in the toxicology of mercury / J.P. Rooney // *Toxicology.* – 2007. – Vol. 234, № 3. – P. 145-56.

191. Sharma, S. Protective effect of curcumin on cadmium induced alteration in serum lipid of albino mice / S. Sharma, A. Kumari // *J. Innov. Pharm. Biol. Sci.* – 2018. – № 5. – P. 45-52.

192. Superoxide dismutase undergoes proteolysis and fragmentation following oxidative modification and inactivation / D.C. Salo, R.E. Pacifici, S.W. Lin [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1990. – Vol. 265, № 20. – P. 11919-27.

193. Tanito, M. Upregulation of thioredoxin system via Nrf2-antioxidant responsive element pathway in adaptive-retinal neuroprotection in vivo and in vitro / M. Tanito, M.P. Agbaga, R.E. Anderson // *Free Radic. Biol. Med.* – 2007. – Vol. 42, № 12. – P. 1838-50.

194. Targeting of Gamma-Glutamyl-Cysteine Ligase by miR-433 Reduces Glutathione Biosynthesis and Promotes TGF- β -Dependent Fibrogenesis / C. Espinosa-Diez,

M. Fierro-Fernández, F. Sánchez-Gómez [et al.] // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2015. – Vol. 23, № 14. – P. 1092-105. doi: 10.1089/ars.2014.6025.

195. The effect of environmental enrichment on glutathione – mediated xenobiotic metabolism and antioxidation in normal adult mice / J.H. Seo, S. Pyo, Y.K. Shine [et al.] // *Front. Neurol.* – 2018. – Vol. 9. – P. 425–429.

196. The systemic toxicity of heavy metal mixtures in rats / S.S. Fiati Kenston, H. Su, Z. Li [et al.] // *Toxicol. Res. (Camb).* – 2018. – Vol 7, № 3. – P. 396-407. doi: 10.1039/c7tx00260b.

197. Transport mechanisms of a novel antileukemic and antiviral compound 9-norbornyl-6-chloropurine / P. Plačková, H. Hřebabecký, M. Šála [et al.] // *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* – 2015. – Vol. 30, № 1. – P. 57-62. doi: 10.3109/14756366.2013.879576.

198. Tunicamycin-Induced ER Stress is Accompanied with Oxidative Stress via Abrogation of Sulfur Amino Acids Metabolism in the Liver / S.H. Kim, D.Y. Kwon, J.H. Kwak [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2018. – Vol. 19, № 12. – P. pii: E4114. doi: 10.3390/ijms19124114.

199. Vidaud, C. Bone as target organ for metals: the case of f-elements / C. Vidaud, D. Bourgeois, D. Meyer // *Chem. Res. Toxicol.* – 2012. – Vol. 25, № 6. – P. 1161-75. doi: 10.1021/tx300064m.

200. Wiechuła, D. An assessment of natural concentrations of selected metals in the bone tissues of the femur head / D. Wiechuła, A. Jurkiewicz, K. Loska // *Sci. Total Environ.* – 2008. – Vol. 406, № 1-2. – P.161-7. doi: 10.1016/j.scitotenv.2008.07.068.

201. X-ray structure of *Fasciola hepatica* Sigma class glutathione transferase 1 reveals a disulfide bond to support stability in gastro-intestinal environment / K. Line, M.N. Isupov, E.J. LaCourse [et al.] // *Sci. Rep.* – 2019. – Vol. 9, № 1. – P. 902. doi: 10.1038/s41598-018-37531-5.

202. Youness, E.R. Cadmium impact and osteoporosis: mechanism of action / E.R. Youness, N.A. Mohammed, F.A. Morsy // *Toxicol. Mech. Methods.* – 2012. – Vol. 22, № 7. – P. 560-7. doi: 10.3109/15376516.2012.702796.

203. Yuan, L. Glutathione in liver diseases and hepatotoxicity / L. Yuan, N. Kaplowitz // *Mol. Aspects Med.* – 2009. – Vol. 30, № 1-2. – P. 29-41. doi: 10.1016/j.mam.2008.08.003.

204. γ -Glutamylcysteine exhibits anti-inflammatory effects by increasing cellular glutathione level / Y. Yang, L. Li, X. Dong [et al.] // *Redox Biology.* – 2019. – Vol. 20. – P. 157-166.