

УДК [557.112.8:546.47] : 599.232.4 : 591.1

ВПЛИВ ХЕЛАТОРІВ НА КЛІТИНИ, ЯКІ МІСТЯТЬ ЦИНК, ЩО УТВОРЮЄ ХЕЛАТИ

Єщенко Ю.В.

*Запорізький національний університет, Запоріжжя, Україна
E-mail: vd.bovt@gmail.com*

Хелатори є стресорами. Особливістю впливу цитотоксичних хелаторів є пошкодження клітин, що містять цинк, що утворює хелати та порушення металолігандного гомеостазу. Було показано, що введенням цитотоксичних хелаторів тваринам можна моделювати патологічні стани, що пов'язані з порушенням механізмів металолігандного гомеостазу (епілептиформні судоми, цукровий діабет, імунодефіцит тощо). Загальною особливістю стресової реакції, що викликана введенням хелаторів є пошкодження клітин, що містять цинк, що утворює хелати із трьохфазною зміною його вмісту. Ця форма стрес-реакції була позначена як «хелатоз».

Ключові слова: клітини, цинк, що утворює хелати, хелатори, хелатоз.

ВСТУП

Хелатори – обширна група органічних сполук, що здатні утворювати із металами клешньовидні комплекси (хелати) [4, 10, 14, 15]. Вони широко застосовуються в промисловості, сільському господарстві, фармакології та медицині. Зв'язувати метали в хелатовані форми можуть багато фармакологічно активних речовин: антимікробні, протипухлинні, психотропні препарати та ін. До того ж хелаторами є антидоти, які застосовують для зв'язування та виведення з організму токсичних та радіоактивних елементів [3, 11].

Сполуки із вираженими хелаторними властивостями можуть утворюватись в самому організмі в результаті глибоких порушень обміну речовин, у зв'язку з чим все частіше обговорюється питання про їх можливу роль як патогенетичного фактору розвитку таких захворювань як цукровий діабет, шизофренія, хвороби Паркінсона та Альцгеймера [1, 2, 5, 12, 13, 16, 17, 20].

Цинк є одним з найважливіших мікроелементів в організмі людини та хребетних тварин. Він входить до активного центру більше ніж 300 металоферментів, бере участь у транскрипції генів, у процесах диференціації, росту та розвитку організму, у репродуктивних процесах, імунних реакціях тощо [21–23].

Варто зазначити, що цинк в організмі присутній в двох формах. Перша форма – міститься у всіх клітинах організму у вигляді міцно зв'язаних із біолігандами катіонів. Друга форма – так званий цинк, що утворює хелати, який міститься у секреторних гранулах ряду клітин (нейронах гіпокампу, аксозазальних синапсах гіпоталамусу, кортикотрофах гіпофізу, ендокриноцитах сітчастої зони наднирників, клітинах слинних залоз, В-клітинах підшлункової залози, клітинах Панета, клітинах

епітелію передміхурової залози, гранулоцитах крові) [1, 5, 9, 20, 22, 24, 25]. Фізіологічне значення цинку, що утворює хелати на даний час остаточно не встановлено, хоча не викликає сумніву той факт, що він відіграє важливі функції в цих клітинах, оскільки тяжкі порушення їх функцій завжди супроводжуються зменшенням в них вмісту цього мікроелементу [5-8, 19, 26, 27].

Метою нашої роботи було дослідження впливу хелаторів із цитотоксичною дією на клітини, що містять цинк, що утворює хелати.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

У дослідах були використані нелінійні щури – самці, віком 10-12 міс, масою 263 ± 18 г. 120 тварин складала 3 дослідні групи, 30 – три контрольні. Тварини утримувались в умовах віварію, температура повітря складала 20-22 °С, світловий день – 8 годин, доступ до їжі та води – *ad libitum*.

Для отримання інтравітальної реакції хелаторів в нейронах гіпокампу, клітинах передміхурової залози, гранулоцитах крові та інших клітинах, що містять цинк, що утворює хелати тваринам дослідних груп (по 40 особин в кожній групі) внутрішньочеревно вводили хелатори в дозі: 8-БСХ – 200 і 400 мг/кг, 8-ТСХ – 200 мг/кг, дитизон – 100 мг/кг. В якості нехелатуючого пошкоджуючого агента, тропного до В-клітин підшлункової залози тваринам вводили розчин алоксану (200 мг/кг, підшкірно). Тваринам контрольних груп (також по 10 особин в групі) вводили воду для ін'єкцій тим самим способом і в тому об'ємі, як і тваринам дослідних груп.

Тварин у кількості 10 особин виводили із дослідження через 10 хв, 2, 8 та 24 год після введення речовин. Після декапітації під ефірним наркозом у тварин брали шматочки органів (гіпокампу, підшлункової залози, клубової кишки, передміхурової залози) та за допомогою заморожуючого мікротому робили зрізи 10 мкм завтовшки. Зрізи переносили на предметні скельця та забарвлювали високоселективним реагентом для визначення цинку – 0,01 % ацетоновим розчином 8-ТСХ [18]. Забарвлені препарати досліджували за допомогою люмінесцентного мікроскопу Люмам, оснащеного цифровою камерою при загальному збільшенні $\times 1000$. У клітинах спостерігали люмінесценцію комплексу 8-ТСХ з цинком жовто-зеленого кольору. Для цитофотометрії цифрових зображень препаратів клітин Панета використовували програму NIH ImageJ. Отримані дані про інтенсивність флуоресценції переводили в кількісну шкалу за допомогою калібрувальної кривої, яку отримували шляхом фотометрії серії стандартних розчинів комплексу 8-ТСХ із цинком відомих концентрацій. Результати вимірювань концентрації цинку, що утворює хелати в клітинах виражали у мкг/г стандартного розчину. Для проведення морфологічного аналізу тканину фіксували у 10% розчині формаліну. Фіксовану тканину за стандартною методикою заливали в парафінові блоки, з яких робили зрізи 10 мкм завтовшки. Зрізи наклеювали на предметні скельця, депарафінували та забарвлювали гематоксилін-еозіном.

Для статистичної обробки результатів досліджень використовували методи варіаційної статистики (середнє арифметичне, стандартне відхилення), порівняння вибірок (U-критерій Мана-Уїтні). Розрахунки проводили за допомогою пакету прикладних програм STATISTICA, версія 6.1.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Спочатку порівнювали вплив хелаторів та агентів нехелаторної природи. Для порівняльного аналізу впливу на клітини, що містять цинк, що утворює хелати цитотоксичного хелатору та цитотоксичного агенту нехелаторної природи було проведено дослідження, в якому тваринам вводили алоксан, який як відомо викликає селективне ушкодження В-клітин підшлункової залози. Порівняльний аналіз вмісту цинку в В-клітинах тварин які отримували алоксан та тварин які отримували дитизон наведені на рис. 1.

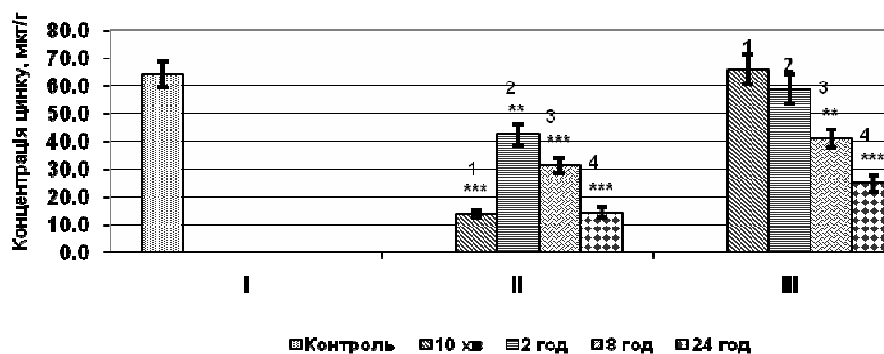


Рис. 1. Вміст цинку, що утворює хелати в В-клітинах підшлункової залози щурів після введення дитизону та алоксану: I – контроль; II – уведення дитизону в дозі 100 мг/кг; III – уведення алоксану в дозі 100-200 мг/кг; 1 – 10 хв після введення реагенту; 2 – 2 год після введення реагенту; 3 – 8 год після введення реагенту; 4 – 24 год після введення реагенту.

Морфологічна картина острівців підшлункової залози після введення алоксану дещо відрізнялась від тієї, що спостерігали при введенні хелаторів. В-клітини острівців тварин через 10 хвилин після введення алоксану не відрізнялись від таких у контрольних тварин. Перші незначні ознаки некрозу клітин виявлялися лише через 2 год. З часом ці зміни ставали більш вираженими, досягаючи максимуму на 24-ту год.

Зазначимо, що при введенні алоксану зовсім не спостерігаються фазні коливання цинку, концентрація якого в В-клітинах знижувалась в міру розвитку необоротних процесів, початок яких відмічався через 2 год після ін'єкції. Підвищення вмісту цинку на першій стадії можна пояснити підвищеною секрецією наднирковими залозами глюкокортикоїдів.

Порівняння впливу різних хелаторів (дитизону та 8-ТСХ) на клітини, що містять цинк, що утворює хелати (нейрони гіпокампу, клітини Панета, клітини простати та гранулоцити) наведені на рис. 2.

Морфологічні зміни клітин спостерігались вже після 10 хв після введення хелаторів. До них можна віднести збільшення та розпилення деяких цитоплазматичних гранул, підсиленням базофілії та метахроматичної реакції клітин, що вірогідно пов'язано із декомпартменталізацією лізосомально-сегрегаційного апарату.

ВПЛИВ ХЕЛАТОРІВ НА КЛІТИНИ, ЯКІ МІСТЯТЬ ЦИНК,...

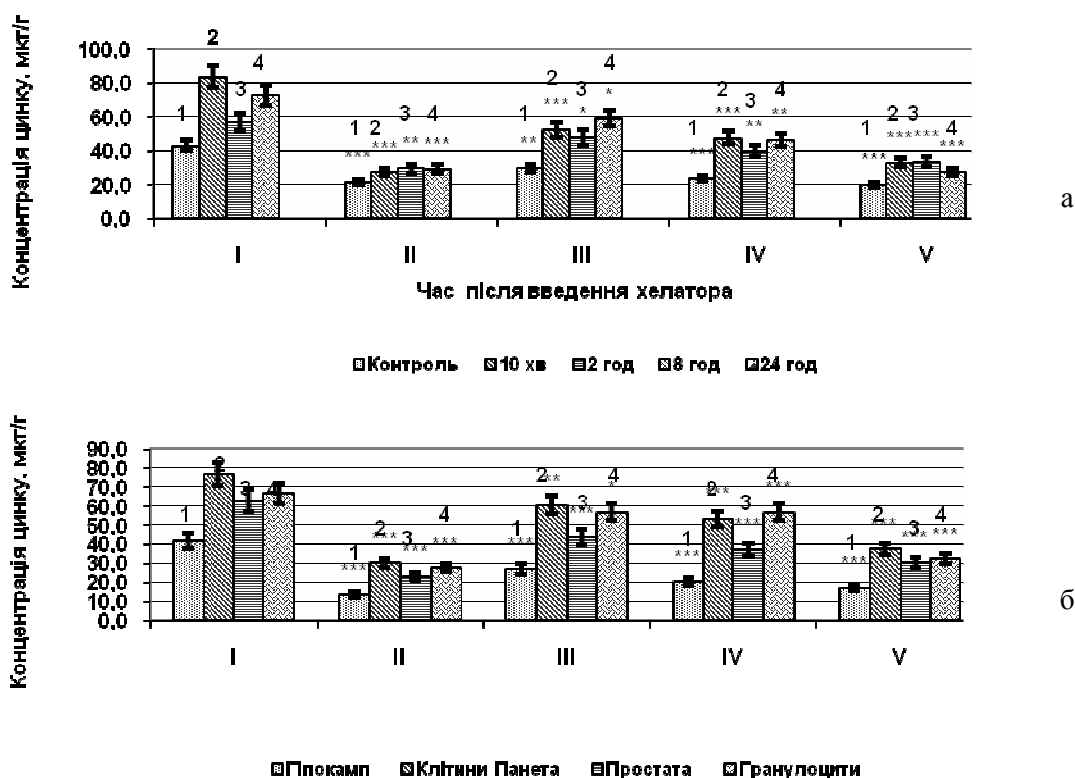


Рис. 2. Вміст цинку в клітинах що містять цинк, що утворює хелати після введення хелаторів: а – введення дитизону; б – введення 8-ТСХ; I – контроль; II – 10 хв після введення реагенту; III – 2 год після введення реагенту; IV – 8 год після введення реагенту; V – 24 год після введення реагенту

Початок некрозу відмічався через 2 год після введення хелаторів та характеризувався пікнозом, рексисом та лізисом ядер, зморщуванням цитоплазми. Максимум некротичних змін відмічався через 8 год після введення хелаторів. Деструктивні зміни в клітинах супроводжувались подальшим пошкодженням цитоплазматичних гранул, зменшенням їх кількості. В екзокринній частині підшлункової залози патологічних змін виявлено не було. При введенні води для ін'єкцій контрольним тваринам морфологічні зміни в клітинах острівців підшлункової залози не спостерігались.

Також було встановлено, що деякі хелатори викликають у тварин конвульсії, сила і тривалість яких обумовлена вмістом металів, що утворюють хелати у гіпокампі, а також таксоном особин (рис. 3). Найбільш виражені судоми виникають при введенні 8-БСХ. Конвульсивний ефект обумовлений інтравітальною реакцією хелаторів у глутаматергічних синапсах (рис. 3).

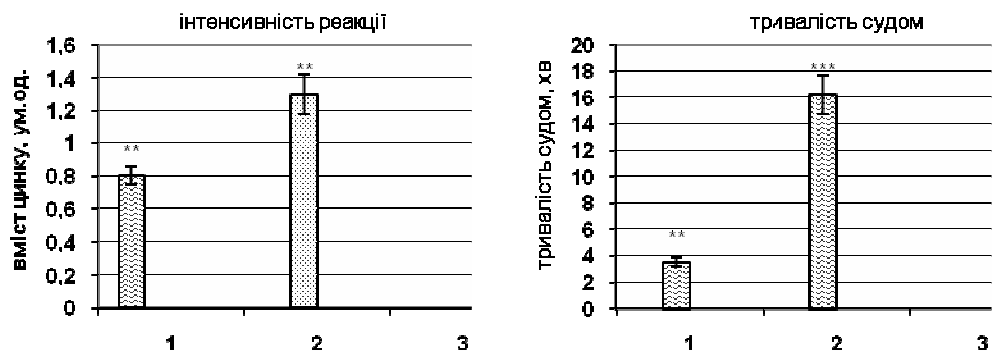


Рис. 3. Інтенсивність інтравітальної реакції 8-БСХ в гіпокампі у мишей і тривалість судом при введенні цитотоксичних (8-БСХ у дозах 200 і 400 мг/кг) і нецитотоксичних (ДЕДТКН у дозі 1000 мг/кг) хелаторів. 1 – введення 8-БСХ у дозі 200 мг/кг; 2 – введення 8-БСХ у дозі 400 мг/кг; 3 – введення ДЕДТКН у дозі 1000 мг/кг.

Як видно з наведеного рисунка, введення тваринам цитотоксичного хелатора 8-БСХ у дозах 200 і 400 мг/кг викликає різні, залежні від дози зміни вмісту цинку у нейронах гіпокампу. Простежується залежність інтенсивності інтравітальної реакції від дози реагенту, що вводиться. В той же час попереднє введення нецитотоксичного хелатора ДЕДТКН призводило до негативної реакції на цинк за допомогою реакції 8-ТСХ, що можна пояснити більш високою константою стабільності введеної речовини з даним металом. Розвиток судом відповідав змінам вмісту цинку в клітинах, що проявлялося у тривалості судом, які були більш виражені при введенні 8-БСХ у дозі 400 мг/кг у порівнянні з дозою 200 мг/кг. Уведення ДЕДТКН не викликало розвиток судом у тварин навіть при дозі 1000 мг/кг.

Таким чином, цитотоксичні хелатори здатні утворювати комплекси з металами не позбавляючи останні функціональної активності, що призводить до вивільнення нейромедіатора (глутамінової кислоти), даючи змогу не тільки провести збудження через синапс, а навіть посилити його, викликаючи епілептиформні судом. В той же час нецитотоксичні хелатори здатні утворювати комплекси з цинком, позбавляючи його функціональної активності і блокуючи вивільнення медіатора в синаптичній щілині. Таку властивість цитотоксичних хелаторів можна використовувати для моделювання епілептиформних судом в експерименті.

З даних наведених на рисунку 1 наочно можна простежити трьохфазну зміну вмісту цинку, що утворює хелати в клітинах: фаза первинного зниження його вмісту (через 10 хв після ін'єкції хелатора), фаза часткового її відновлення (через 2 год), фаза вторинного зниження вмісту цинку (через 24 год).

Первинне зниження вмісту цинку спостерігалось вже через 3 хв після введення хелатора, досягаючи свого максимуму на 10 хв. Розвиток цієї фази пов'язаний із інтравітальною реакцією хелаторів в клітинах.

Друга фаза (тимчасового відновлення вмісту цинку в клітинах) обумовлена здатністю неальтерованих цитоплазматичних гранул знову приєднувати іони цинку

після їх відщеплення хелатором. Напевне, накопичення цинку в клітинах пов'язано з ацидотропною дією хелаторів, що гальмує секреторну активність клітин.

Розвиток третьої фази (вторинного зниження вмісту цинку в клітинах) пов'язаний із розвитком в них необоротних деструктивних змін. Її початок фактично співпадає в часі із початком некрозу клітин. По мірі розвитку клітинного некрозу вміст цинку, що утворює хелати прогресивно знижується. Ці зміни неспецифічні, подібні фазам стресу.

Описані в третій фазі зміни вмісту цинку в клітинах також спостерігаються при дії нехелатуючих агентів на стадії викликаного ними некрозу клітин. Це говорить про те, що на стадії розвитку необоротних змін у клітинах вміст цинку в них змінюється таким же чином, як і при дії різних альтеруючих хелаторів. У зв'язку із цим порушення обміну цинку в клітинах, що викликаються хелаторами, можна відзначати на стадіях, які передують початку некрозу клітин, тобто на першій та другій фазах.

Таким чином, трьохфазні зміни вмісту цинку, що утворює хелати в клітинах – характерна ознака їх ураження хелаторами. Перші дві фази передують деструктивним змінам у клітинах острівців. При дії нехелатуючих агентів фазні коливання цинку до розвитку клітинного некрозу не спостерігалися. Ступінь вираженості першої та третьої фаз при введенні хелаторів залежить від дози хелатора та їх комплексоутворюючої здатності.

Втрату цинку клітинами слід розглядати як втрату їх життєздатності, негативна реакція на цинк – показник загибелі цих клітин. Відновлення вмісту цинку до його вихідного рівня свідчить про повне відновлення їх функції.

Порівнюючи зміни при введенні хелаторів в усіх досліджених органах виявлено однотипні зміни. Ці зміни допомагають визначити роль металів, що утворюють хелати у процесах адаптації та віднести хелатори до стресових чинників, виділити особливий вид клітинного ушкодження при їх дії, позначений нами як хелатоз. У залежності від переважаючого ураження відповідних видів клітин можна виділити декілька форм хелатозу: панкреатична, інтестинальна, з ураженням статевого апарату, імунодефіцитна.

Зміни у клітинах, що містять цинк, що утворює хелати при дії хелаторів зумовлені кількістю металів, що утворюють хелати у цих клітинах, дозою хелатора та його хелатуючими властивостями. Тяжкість ураження залежить від кількості металу, що утворює хелати: чим більша кількість, тим важче ураження. З огляду на вищевказане можна запропонувати наступну схему (рис. 4), що пояснює таке поняття як «хелатоз».

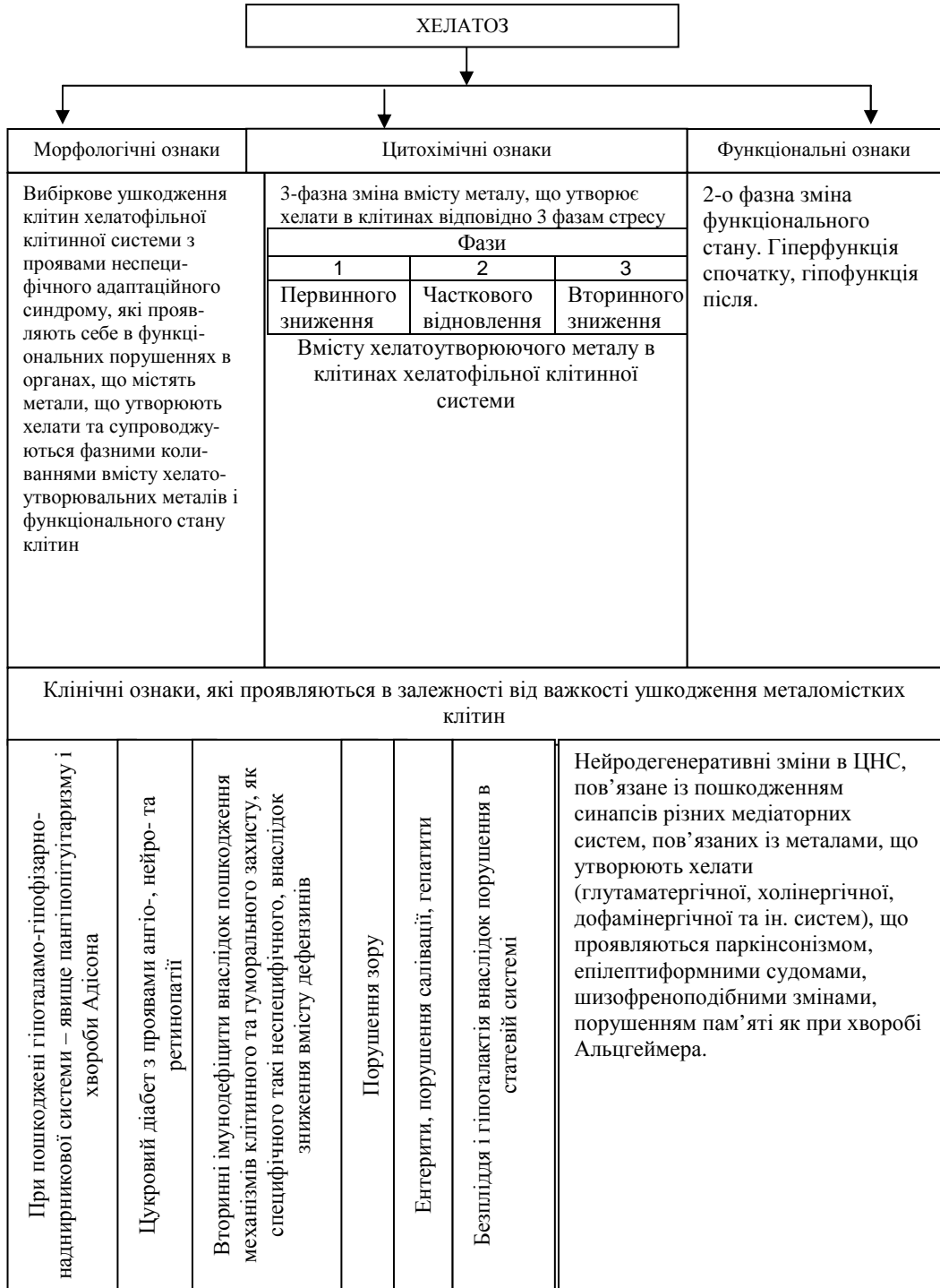


Рис. 4. Схема хелатозу.

ВИСНОВКИ

З отриманих результатів можна зробити наступні висновки

1. Виявлена особливість хелаторних пошкоджень клітин, що містять метали, що утворюють хелати – це вибіркова альтерація цих клітин з розвитком трифазних коливань вмісту металів у клітинах, які подібні до фаз стресу, що дає можливість для виділення особливої форми клітинного ушкодження, яку пропонується позначати терміном «хелатоз».
2. Хелатори-хромофори можуть застосовуватись для досить достовірного моделювання патологічних процесів (цукровий діабет, епілепсія, шизофренія, хвороба Альцгеймера, ентеропатія, ретинопатія, гіполітуарізм та інші) які пов'язані з порушенням функціонування органів, в яких є клітини, що містять метали, що утворюють хелати. Також при цих станах потрібна корегуючи терапія ліками, що містять цинк.

Список літератури

1. Гольдберг Е.Д. Сахарный диабет. Этиологические факторы / Гольдберг Е.Д., Ещенко В.А., Бовт В.Д. – Томск : изд-во Томского ун-та. – 1993. – 135 с.
2. Иванчев Г. Дитизон и его применение / Иванчев Г. – М.: ИЛ, 1961. – 450 с.
3. Подымов В.К., Молекулярные основы лигандной патологии и хелатной фармакологии / В.К. Подымов, С.П. Гладких, Л.А. Пирузян // Хим.-фарм. журн. – 1982. – № 1. – С. 9-14.
4. Принципы изучения болезней предположительно химической этиологии и их профилактика / ВОЗ. – Офіційне видання. - Женева: ВОЗ, 1990. – 75 с.
5. Альберт А. Избирательная токсичность / Альберт А. – М.: Медицина, 1998. – 432 с.
6. Крисс Е.Е. Координационные соединения в медицине / Крисс Е.Е., Волченкова А.Н., Григорьева А.С. – К.: Наукова думка, 1986. – 216 с.
7. Авцын А.П. Микроэлементозы человека: этиология, классификация, органопатология / [А.П. Авцын, А.А. Жаворонков, М.А. Риш, Л.С. Строчкова] – М. : Медицина, 1998. – 496 с.
8. Акбаров А.Б. Бионеорганическая химия металлов, аминокислот и биокомплексонов / А.Б. Акбаров, Ю.Я. Харитонов– Ташкент, 1994. – 346 с.
9. Кудрин А.В. Микроэлементы в неврологии / А.В. Кудрин, О.А. Громова – М.: ГЭОТАР-Мед, 1998. – 496 с.
10. Скворцов И.А. Об эффективности лечебного применения комплексонов при некоторых заболеваниях экстрапирамидной системы у детей / И.А. Скворцов, Г.Е. Руденская, А.Н. Карасева // Журн. невропатол. и психиатр. им. С.С. Корсакова. – 1987. – № 10. – С. 1457-1462.
11. Радбиль О.С. Цинк в норме и при патологических состояниях / О.С. Радбиль // Вопросы питания. - 1981. - №6. - С. 63 - 70.
12. Райцес В.С. Нейрофизиологические основы действия микроэлементов / Райцес В.С. - Л.: Медицина, 1981. - 152 с.
13. Armstrong C. Comparative effects of metal chelating agents on the neuronal cytotoxicity induced by copper, iron and zinc in the hippocampus / C. Armstrong, W. Leong, G.J. Lees // Brain Res. – Vol 892, № 1. – P. 51-62 (2001).
14. Auld D.S. Zinc coordination sphere in biochemical zinc sites / D.S. Auld // Biometals. – Vol. 14. – P. 271-313 (2001).
15. Bettger W.T. A critical physiological role of zinc in structure and function of biomembranes / W.T. Bettger, L.L. O'Dell // Life Sci. - Vol. 28. - P. 1404–1438 (1981).
16. Blalock J.E. On the evolution of ligands: did peptides functionally precede metals and small organic molecules / J.E. Blalock // Cell. Mol. Life Sci. - Vol. 55. – P. 513-518. (1999).
17. Єщенко Ю.В. Стрес і метаболізм металів: монографія / Єщенко Ю.В. – Запоріжжя : ЗНУ, 2010. – 286 с.