

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

_____ Е.И. Шишацкая

подпись

инициалы, фамилия

« _____ »

июня 2016г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 - Биология

Влияние техногенной нагрузки города Норильска на метаболизм
эритроцитов и гепатоцитов мышей

Руководитель

подпись, дата

доцент, к.б.н.

должность, ученая степень

Ю.С. Аكوпова

инициалы, фамилия

Выпускник

подпись, дата

И.Б. Лескова

инициалы, фамилия

Красноярск 2016

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	3
Основная часть	5
1 Обзор литературы	5
1.1 Экологическая обстановка на территории города Норильска	5
1.2 Клеточный состав крови.....	8
1.2.1 Эритроциты	8
1.2.2 Лейкоциты	8
1.2.3 Тромбоциты.....	10
1.3 Взаимосвязь между метаболизмом и функциональной активностью эритроцитов	11
1.4 Взаимосвязь между метаболизмом и функциональной активностью клеток печени	12
1.4.1 Углеводный обмен.....	15
1.4.2 Липидный обмен	15
1.4.3 Белковый обмен	15
1.6 Влияние тяжелых металлов на метаболизм клетки.....	16
2 Материалы и методы	19
2.1 Объект исследования	19
2.2 Методы исследования.....	20
2.2.1 Методика приготовления мазка крови	20
2.2.2 Подсчет лейкоцитарной формулы под микроскопом	21
2.2.3 Приготовление гомогената печени	24
2.2.4 Определение содержания гемоглобина	24
2.2.5 Определение содержания белка	25
2.2.6 Билюминесцентное определение активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в эритроцитах и гомогенате печени	26
2.2.7 Статистические методы исследования	30
3 Результаты и обсуждения	Ошибка! Закладка не определена.
Заключение	Ошибка! Закладка не определена.
Список сокращений	31
Список использованных источников	32

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Экологическая ситуация в Норильском промышленном районе чрезвычайно серьезна: город Норильск, построенный в 1953 г., с населением 168,5 тыс. чел. (по данным 2013 года) находится в центре промышленной зоны и блокирован плавильными производствами со всех сторон [1]. Концентрации ряда загрязняющих веществ, в том числе тяжелых металлов, выбрасываемых ОАО «ГМК «Норильский никель»» во внешнюю среду, в почвах, мхах и лишайниках достигают экстремально высоких значений.

Концентрации ряда загрязняющих веществ превышают значения ПДК. По диоксиду серы – в 7 раз, по оксиду никеля – в 2,15 раза, по диоксиду азота – 1,4 раза, по оксиду меди – в 2,25 раза [2].

Пагубное воздействие такой экологической ситуации на организм человека, животных и растений чрезвычайно велико. Токсические газы могут вызывать отеки легких, ацидоз, опухоли различных органов (в основном легких), бронхиты, эмфиземы, образование метгемоглобина, карбоксигемоглобина. Тяжелые металлы, связываясь с кислородом препятствуют окислительному фосфорилированию, а связываясь с сульфгидрильными группами инактивируют многие ферменты, возникающий при этом дефицит АТФ сопровождается нарушением функции многих органов (легких, почек, кроветворной ткани), однако, в первую очередь, страдают ткани с высокой степенью метаболизма – печень и головной мозг [3,4].

Люди, проживающие в Норильске, в 2 раза чаще болеют онкологическими заболеваниями, дерматитами и различными заболеваниями дыхательных путей. Средняя продолжительность жизни в Норильске на 10 лет меньше, чем в других регионах России [5,6].

Таким образом, **целью** данной работы явилось изучение характерных особенностей метаболизма эритроцитов и гепатоцитов мышечной ткани в условиях техногенной нагрузки города Норильска.

Исходя из цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Выявить основные загрязняющие вещества атмосферы города Норильска на основании годового отчета компании «Норильский никель».
2. Провести сравнительный анализ показателей лейкоцитарной формулы крови мышечной ткани между контрольной и экспериментальной группами.
3. Оценить состояние метаболизма эритроцитов мышечной ткани, находящихся в условиях техногенной нагрузки города Норильска.
4. Исследовать особенности метаболической системы клеток печени мышечной ткани, находящихся в условиях техногенной нагрузки города Норильска.

Данная работа выполнялась на базе кафедры медицинской биологии Института фундаментальной биологии и биотехнологии Сибирского федерального университета совместно с ФГБУ "НИИ медицинских проблем севера" СО РАМН.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1 Обзор литературы

1.1 Экологическая обстановка на территории города Норильска

Экологическая обстановка на территории города Норильска определяется целиком результатами производственной деятельностью ОАО "ГМК "Норильский никель" по добыче и производству цветных и драгоценных металлов из месторождений комплексных сульфидных медно-никелевых руд Таймыра. Основным загрязняющим веществом в атмосфере города является диоксид серы, выбрасываемый в воздух металлургическими предприятиями при пирометаллургической переработке концентратов обогащения Норильской и Талнахской обогатительными фабриками.

Вместе с тем, в широком доступе нет подробной и достаточно полной статистики, которая бы охарактеризовала бы как степень загрязнения окружающей среды, так и развитие загрязнения в течение времени.

Общественные и экологические организации пользуются либо данными собственных исследований, либо данными эпизодических мониторингов по отдельно взятым проблемам (влияние загрязнения на леса и тундру, загрязнение подземных вод и так далее). Экологическую обстановку в городе Норильске до сих пор комплексно никто не проводил. Со стороны общественности эта задача до сих пор является предметом требований [3].

По данным за 2014 г. в общих выбросах края от стационарных источников - 2507,6 тыс. т основную роль играли выбросы Норильского промрайона – 1925,9 тыс. т, что составляет 76,8 % от суммарных выбросов края. Суммарные выбросы края (без Норильского промрайона) составили 581,7 тыс. т, что более чем в 3 раза меньше выбросов Норильского промрайона [2]. Наглядные показатели выбросов видны в таблице 1.1.

Таблица 1.1- Выбросы в атмосферу основных предприятий-загрязнителей отрасли края в 2014-2015 гг.

Предприятия	Выбросы в атмосферу (тыс. т)			Доля предприятий в выбросах (%)					
	2013	2014	2015	отрасли			Красноярского края		
				2013	2014	2015	2013	2014	2015
ЗФ ОАО «ГМК «Норникель»	1946,4	1938,5	1912,0	94,9	92,2	92,8	77,3	75,1	76,2
ОАО «РУСАЛ Ачинск»	38,7	37,9	36,9	1,9	1,8	1,8	1,5	1,5	1,5
ОАО «РУСАЛКрасноярск»	65,8	65,5	62,2	3,2	3,1	3,0	2,6	2,5	2,5
Итого	2050,9	2041,9	2011,1	99,9	97,1	97,6	81,5	79,1	80,2
Суммарные выбросы по отрасли	2064,3	2102,8	2060,9	100	100,0	100	82,0	81,4	82,2
Суммарные выбросы по краю	2516,8	2582,7	2507,6				100	100	100

Таблица 1.2 - Выбросы загрязняющих веществ в атмосферу в городах края в 2015 году

Наименование городов края	Численность городского населения на 01.01.2015 (тыс. человек)	Количество выбросов загрязняющих веществ (тыс. т)			Количество выбросов на 1 жителя (т)
		всего	от стационарных источников	от автотранспорта	
Ачинск	107,8	56,3	42,9	13,4	0,52
Железногорск	94,0	16,8	10,9	5,9	0,18
Красноярск	1036,6	234,6	145,6	89,0	0,23
Канск	92,1	11,7	6,1	5,6	0,13
Лесосибирск	65,2	16,5	12,4	4,1	0,25
Норильск	177,3	1935,6	1925,9	9,7	10,9
Сосновоборск	35,5	4,3	0,01	4,3	0,12
Зеленогорск	64,3	70,4	66,3	4,1	1,09
Итого по 8 городам	1719,3	2352,6	2133,1	142,3	1,37
Всего по краю	2852,8	2820,6	2507,6	313,0	0,99
В долях от края, %	60,3	83,4	85,1	45,5	

Объем валовых выбросов от стационарных и передвижных источников в 9 городах края составляет 83,4 % общекраевых выбросов, в том числе от

стационарных источников – 85,1 %, от автотранспорта – 45,5 %. Данные приведены в таблице 1.2.

В таблице 1.3 приведены количества выбросов основных загрязняющих веществ в городах – промышленных центрах Красноярского края. По этим данным видно, что в Норильске выбрасывается в атмосферу диоксида серы и специфических загрязняющих веществ больше, чем в других городах [8].

Таблица 1.3 - Структура выбросов загрязняющих веществ в атмосферу от стационарных источников в городах - промышленных центрах края в 2015 г

Город	Выбросы загрязняющих веществ в атмосферу							Выбросы специфических ЗВ, тыс. т	Кол-во предпр.	Кол-во источн. выбросов загряз.в-в
	Всего, тыс. т	твердые, тыс. т	диоксид серы, тыс. т	оксид углерода, тыс. т	оксиды азота, тыс. т	углеводород., тыс. т	ЛОС, тонн			
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Ачинск	42,9	19,32	5,23	4,82	8,56	н/д	32,5	25,9	31	722
Красноярск	145,6	22,06	27,07	69,12	23,55	0,05	1025,7	24,3	200	5053
Канск	6,12	2,77	1,23	1,32	0,64	0,02	60,6	2,94	25	577
Лесосибирск	12,38	2,18	1,22	7,61	0,65	0,09	72,9	2,91	21	378
Минусинск	1,50	0,20	0,08	1,09	0,05	0,02	47,0	0,28	24	975
Назарово	43,16	12,4	17,92	1,31	9,82	н/д	135,2	14,1	20	373
Бородино	3,42	0,28	0,01	0,57	1,53	н/д	789,6	1,31	5	124
Норильск	1925,9	10,28	1881,2	6,43	10,38	2,94	506,5	28,0	19	2981
Всего по пром. центрам	2181,0	69,5	1934,0	92,3	55,2	3,12	2670,0	99,7	345	11183
Всего по краю	2507,6	115,6	1983,6	243,7	102,8	17,67	15133,2	177,4	863	22346

1.2 Клеточный состав крови

1.2.1 Эритроциты

Эритроциты – это клетки крови позвоночных организмов, в том числе человека, и некоторых беспозвоночных, которые выполняют транспортную функцию кислорода от легких к органам и тканям и углекислого газа от тканей к легким. Кислород переносится за счет входящего в состав эритроцитов гемоглобина, который содержит ионы железа. Именно железо придает этим клеткам красный цвет.

Эритроциты имеют форму двояковогнутого диска с диаметром 7-8 мкм. В отличие от других клеток организма они являются клетками, не имеющими ядра, рибосом и митохондрий. В среднем эритроциты функционируют в течение 100-120 суток. Разрушаются эритроциты в селезенке и печени. Эритроцит, погибая, выделяет железо, которое используется костным мозгом для образования новых эритроцитов.

В костном мозге, эритроциты образуются из эритробластов. Они обладают огромным ядром, которое занимает почти всю клетку. Кроме того, в эритробластах отсутствует гемоглобин. Далее эритробласты преобразуются в нормобласты первого, второго и третьего порядка. На этих этапах развития объем ядра постепенно уменьшается и клетка заполняется гемоглобином. Затем нормобласт становится ретикулоцитом, когда полностью теряет ядро. На следующем этапе ретикулоцит становится зрелым эритроцитом, поступающим из костного мозга в общий кровоток. Но даже при нормальном эритропоэзе в кровь поступает незначительное количество ретикулоцитов.

1.2.2 Лейкоциты

Лейкоциты – белые кровяные клетки. Данный тип клеток крови различен по виду клеток и выполняемыми ими функциями. Выделены в общую группу по наличию ядра и отсутствия окраски.

Лейкоциты в зависимости от того, однородна ли их протоплазма или содержит зернистость, делят на 2 группы: зернистые или гранулоциты, и незернистые или агранулоциты. Гранулоциты в зависимости от гистологических красок, какими они окрашиваются, бывают трех видов: базофилы (окрашиваются основными красками), эозинофилы (кислыми красками) и нейтрофилы (и основными, и кислыми красками). Нейтрофилы по степени зрелости делятся на метамиелоциты (юные), палочкоядерные и сегментоядерные [9].

1.2.2.1 Гранулоциты

Эозинофилы – составляют 1 – 4 % всех лейкоцитов. Они разрушают и обезвреживают токсины белкового происхождения и чужеродные белки. Когда в организм попадают чужеродные белки, то количество эозинофилов увеличивается - это называется эозинофилия (например, при аллергии, наличии глистной инвазии).

Базофилы (0 – 1 %) содержат в протоплазме гранулы с гепарином, поэтому препятствуют свертыванию крови в очаге воспаления. Этот процесс способствует заживлению. Количество базофилов возрастает при гемофилии.

Нейтрофилы (70 %) находятся в крови 6 – 8 часов, т.к. мигрируют в слизистые оболочки. Их значимая функция – фагоцитоз. Нейтрофилы, имея немалые размеры, способны проникать через стенку эндотелия капилляров и активно двигаться в тканях к месту проникновения чужеродных организмов. Дойдя до места назначения, нейтрофилы благодаря специфическим гранулам, которые содержат лизоцим, щелочную фосфатазу, лактоферрин разрушают и склеивают бактерии, затем с помощью гидролитических ферментов переваривают микроорганизмы. Один нейтрофил может захватить до 15 – 20 бактерий, но при этом погибает сам.

Нейтрофилы – это самые мощные факторы неспецифической клеточной защитной системы крови. Количество таких клеток резко

возрастает при острых воспалительных процессах. Они первыми прибывают в очаг воспаления. В норме в крови обнаруживаются не только зрелые (сегментированные) формы нейтрофилов, но и немного их предшественников – незрелых клеток: палочкоядерные нейтрофилы (3-5 %) и юные (0 – 1 %) [10].

1.2.2.2 Агранулоциты

Моноциты (4 – 8 %) проникают к месту воспаления из крови, превращаясь в макрофаги – гигантские клетки-фагоциты. Когда развивается воспаление, в очаге накапливаются недоокисленные продукты распада, поэтому среда становится кислой. Активность нейтрофилов в таких условиях падает, поэтому в очаг приходят макрофаги, так как они более активны в данной среде. Таким образом, при росте воспаления макрофаги сменяют нейтрофилы.

Лимфоциты (21 – 35 %) – это главное звено клеточной и гуморальной защитных систем организма. Данный тип лейкоцитов активен в течение нескольких лет. Лимфоциты имеют на мембране рецепторы, позволяющие отличать антигены [11].

1.2.3 Тромбоциты

Тромбоциты или кровяные пластинки - это осколки цитоплазмы костномозговых мегакариоцитов. Являются наиболее мелкими по величине (1-3 мкм) форменными элементами крови.

В 1 микролитре крови в норме содержится 150-450 тыс. тромбоцитов. Тромбоциты живут в среднем 3-5 дней. Различают зрелые, юные и старые клетки данного типа. Тромбоциты выполняют важную функцию в организме - ангиотрофическую, осуществляют «подкормку» клеток эндотелия. Кроме того, тромбоциты участвуют в процессе гемостаза, а именно – образуют

первичный тромбоцитарный тромб, благодаря способности к адгезии и агрегации.

Повышенное количество тромбоцитов в крови называют тромбоцитозом, сниженное - тромбоцитопенией. В основном данные нарушения возникают при патологиях. Но встречаются и физиологические отклонения уровня тромбоцитов от нормального. Например, количество тромбоцитов снижается в предменструальный период и во время беременности, а при физической нагрузке – увеличивается.

1.3 Взаимосвязь между метаболизмом и функциональной активностью эритроцитов

В зрелых безъядерных эритроцитах обмен веществ направлен на обеспечение их функции как переносчиков кислорода и на выполнении роли посредников при переносе углекислого газа. Следовательно метаболизм эритроцитов отличается от метаболизма других клеток. Прежде всего, он должен поддерживать способность эритроцита обратимо связывать кислород, и для этого обмен веществ должен обеспечивать восстановление гема. В геме содержится двухвалентное железо. Оно постоянно переходит в трехвалентное вследствие спонтанного окисления, но для того, чтобы железо могло связывать кислород, оно должно восстанавливаться в двухвалентное.

Ядерные предшественники эритроцитов содержат стандартный набор ферментов, необходимый как для получения энергии в результате окислительных процессов, так и для синтеза белков. В зрелых эритроцитах протекает преимущественно гликолиз. В данном процессе образуется источник энергии - АТФ [12]. Кроме того, АТФ необходима для активного транспорта ионов через мембрану эритроцита, т.е. для поддержания внутриклеточного градиента концентрации ионов. В эритроцитах вырабатываются также восстанавливающие вещества - восстановленный НАД и восстановленный НАДФ, образующийся в ходе пентозного цикла.

НАД используется на восстановление метгемоглобина в гемоглобин, способный связывать кислород, а НАДФ - на восстановление глутатиона [13]. Глутатион способен легко окисляться. Он защищает от окисления и инактивации ряд важных ферментов, содержащих серу, в частности, ферменты, связанные с молекулой гемоглобина и клеточной мембраной [14].



Рисунок 1 – Метаболизм эритроцита

1.4 Взаимосвязь между метаболизмом и функциональной активностью клеток печени

Гепатоциты – клетки паренхимы печени у позвоночных животных, в том числе человека. Составляют 60-80% печеночной массы. Гепатоциты участвуют в синтезе и хранении белков, трансформации углеводов, синтезе холестерина, желчных солей и фосфолипидов, детоксикации, модификации и выводе из организма эндогенных субстанций. Кроме того, они способствуют процессу желчеобразования [14].

Функции печени:

- детоксикация чужеродных веществ (ксенобиотиков), например, аллергенов, ядов и токсинов, путём превращения их в безвредные, менее токсичные или легче удаляемые из организма соединения;

- обезвреживание и выведение из организма избыточных гормонов, медиаторов, витаминов;

- участвует в пищеварении: обеспечивает энергией организм при помощи глюкозы и преобразования других источников энергии в глюкозу в ходе глюконеогенеза;

- осуществляет запас энергии в виде депо гликогена и регуляцию углеводного обмена;

- служит депо некоторых витаминов (жирорастворимые витамины А, D, водорастворимый витамин В12 – наиболее большие запасы), катионов ряда микроэлементов — металлов (катионов железа, меди и кобальта). Кроме того, принимает непосредственное участие в метаболизме витаминов А, В, С, D, Е, К, РР и фолиевой кислоты;

- синтезирует холестерин и его эфиры, липиды и фосфолипиды, липопротеиды и регулирует липидный обмен;

- синтезирует жёлчные кислоты и билирубин, продуцирует и секретирует жёлчь;

- служит депо для значительного объёма крови, выбрасываемой в общее сосудистое русло при кровопотере или шоке из-за сужения сосудов, кровоснабжающих печень;

- синтезирует гормоны и ферменты, участвующие в переваривании пищи в 12-перстной кишке и других частях тонкого кишечника;

- выполняет кроветворную функцию у плода.

Печень является центральным органом метаболизма. Места схождения обменов углеводов и белков являются такие вещества, как пируват, оксалоацетат и α -кетоглутаровая кислота из цикла Кребса. Они способны в реакциях трансаминирования превращаться, соответственно, в аланин,

аспартат и глутамат. Аналогично протекает процесс превращения аминокислот в кетокислоты.

С обменом липидов углеводы связаны еще более тесно:

- молекулы НАДФН, которые образуются в пентозофосфатном пути, используются для синтеза жирных кислот и холестерина;

- глицеральдегидфосфат, который тоже образуется в пентозофосфатном пути, включается в гликолиз и превращается в диоксиацетонфосфат;

- глицерол-3-фосфат, который образуется из диоксиацетонфосфата в гликолизе, направляется для синтеза триацилглицеролов. Также для этого используется глицеральдегид-3-фосфат, который синтезируется на этапе структурных перестроек пентозофосфатного пути;

- "глюкозный" и "аминокислотный" ацетил-S-CoA способен участвовать в синтезе жирных кислот и холестерина.

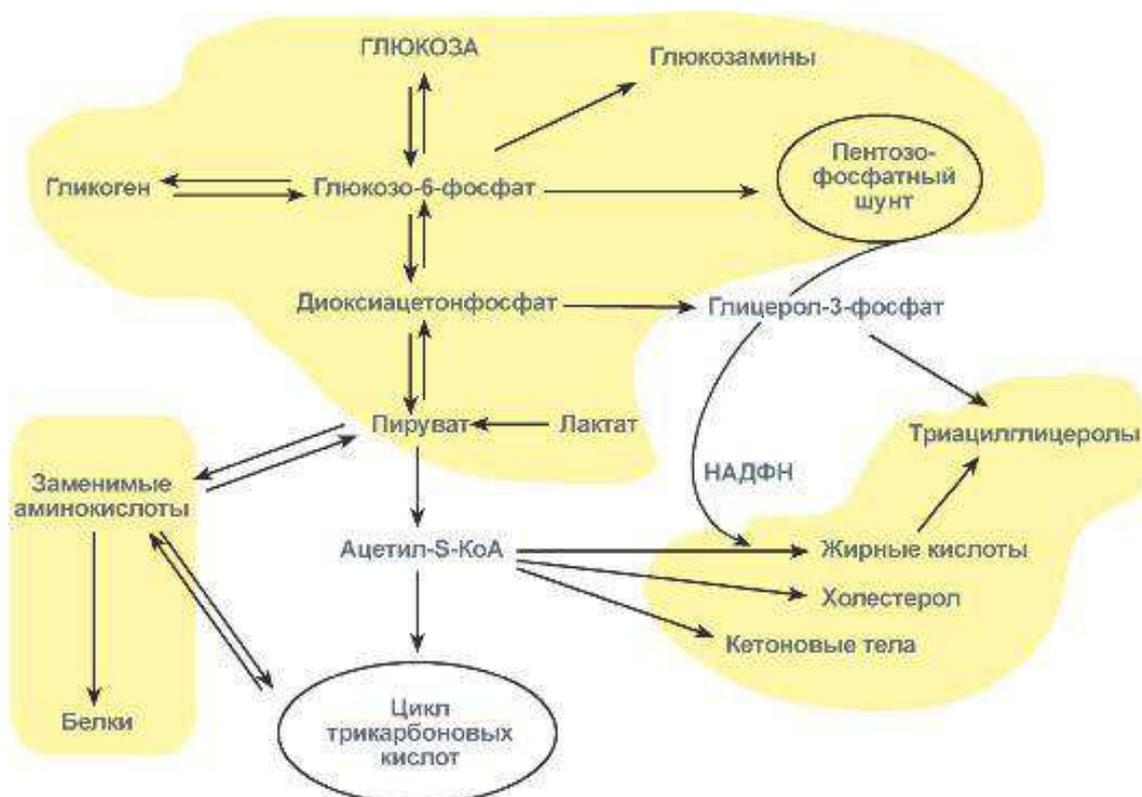


Рисунок 2 - Взаимосвязь обмена белков, жиров и углеводов в печени

1.4.1 Углеводный обмен

Процессы углеводного обмена активно протекают в гепатоцитах. Печень поддерживает концентрацию глюкозы в крови благодаря синтезу и распаду гликогена. Активный синтез гликогена наступает после приема пищи, когда концентрация глюкозы в крови воротной вены достигает 20 ммоль/л. Когда в организм не поступает пища, то печень использует гликогенолиз для поддержания энергетического уровня. В случае длительного голодания основным источником глюкозы крови является глюконеогенез из аминокислот и глицерина.

НАДФН, образуемый в пентозофосфатном пути необходим для микросомального окисления и синтеза жирных кислот, холестерина из глюкозы [16].

1.4.2 Липидный обмен

Печень образует липиды - холестерол и триацилглицеролы (ТАГ), когда в нее поступает избыток глюкозы, который не используется для синтеза, например, гликогена. Печень не запасает триацилглицеролы, поэтому их удаляют происходит липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП). Из холестерина синтезируются желчные кислоты, кроме того он включается в состав липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и ЛПОНП.

Так же в печени синтезируются кетоновые тела (при определенных неблагоприятных условиях, например сахарном диабете). Они используются большим количеством тканей как альтернативный источник энергии.

1.4.3 Белковый обмен

Больше половины белка в организме за сутки синтезирует именно печень. Печеночные белки полностью обновляются за 7 суток, тогда как в

других органах это длиться 17 суток и более. К этому числу относятся белки не только гепатоцитов, но и внепеченочные белки – альбумины, многие глобулины, ферменты крови, а также фибриноген и факторы свертывания крови.

Трансаминирование, дезаминирование и декарбоксилирование с образование биогенных аминов: все эти процессы, связанные с аминокислотами протекают в печени. Так же в печени происходят реакции синтеза холина и креатина благодаря переносу метильной группы от аденозилметионина. Кроме того, в печени происходит утилизация избыточного азота, с включением его в цикл мочевины. А цикл трикарбоновый кислот очень тесно связан с синтезом мочевины.

Таким образом, данные литературы свидетельствуют о высокой значимости метаболических процессов печени в обеспечении многих функций организма. Причем, эффективность метаболических реакций зависит от исходного уровня обмена веществ, который характеризуется активностью и соотношением энергетических и пластических процессов в клетках. Именно от исходного состояния метаболизма гепатоцитов зависит скорость и интенсивность большого количества важных реакций всего организма. Именно на уровне клеточной физиологии и биохимии возможно выяснение общего состояния организма.

1.6 Влияние тяжелых металлов на метаболизм клетки

В настоящее время существует множество статей и книг посвященных влиянию тяжелых металлов на метаболизм клетки.

Тяжелые металлы обладают способностью накапливаться в живых организмах, включаются в метаболические циклы, образуют высокотоксичные металлорганические соединения, изменяют формы нахождения при переходе от одной природной среды в другую, не подвергаясь биологическому разложению. Этим они и опасны. У человека

тяжелые металлы способны вызывать серьезные физиологические нарушения, токсикоз, аллергию, онкологические заболевания, отрицательно влияют на зародыш и генетическую наследственность.

Наиболее приоритетными поллютантами среди тяжелых металлов являются свинец, медь, кобальт, кадмий, цинк, никель, так как техногенное их накопление в окружающей среде идет высокими темпами. Кроме того, эти вещества обладают большим сродством к важным органическим соединениям в живом организме.

В литературе, в качестве главных патогенетических механизмов цитотоксического действия металлов, рассматриваются: усиление перекисного окисления липидов, нарушение кальциевого гомеостаза и окислительного метаболизма клетки [21].

Так, общее воздействие марганца, железа и селена повышает активность глутатион-S-трансферазы и снижает активность супероксиддисмутазы в печени мышей. Повышение активности глутатион-S-трансферазы обусловлена увеличением скорости удаления окислителя соединений-поллютантов, а снижение супероксиддисмутазы отражает действие кооперативных биохимических путей, которые участвуют в утилизации вредных соединений или предположительного повреждения клеток на генетическом уровне [22].

Цинк в объеме 20 мкг/л, воздействуя на овариальные ткани жабы, увеличивает содержание глутатиона и уменьшает активность ГбФДГ. Данное исследование проводилось как в естественных условиях, так и *in vitro*. И в том и другом случае ГбФДГ неконкурентно подавляется действием цинка [23].

Активность ЛДГ, СДГ и $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATФазы}$ в печени мышей ингибируется кадмием. Понижение активности предположительно связано с взаимодействием кадмия со свободной SH-группой, поскольку сульфгидрильные группы имеют высокое сродство с металлическим кадмием. Этим же объясняется и уменьшение активности СДГ – ионы

кадмия взаимодействуют с флавопротеидом или с SH-группой СДГ, что приводит к угнетению энергии транспортного механизма [24].

Воздействие тяжелых металлов на активность ферментов у осетровых показало, что Mn^{2+} повышают уровень активности щелочной фосфатазы почти на 50% , Fe^{2+} и Co^{2+} так же увеличивают уровень активности щелочной фосфатазы у исследованных видов от 11 до 60%, однако Ni^{2+} , Cu^{2+} и Zn^{2+} , наоборот, ингибируют активность на 5-21% [25]. По видимому, связывание иона металла со специальной константной площадкой (регуляторный или аллостерический центр), которая пространственно отделена от активного центра, происходит с замещением металлокомпонента некоторых ферментов (пептидазы и щелочная фосфатаза) на металл, близкий по атомному строению, поэтому одни ионы ингибируют, а другие активируют действие фермента [26].

Таким образом, показано, что тяжелые металлы достаточно сильно затрагивают метаболизм клетки. Ингибируя многие ферменты, активируя перекисное окисление липидов, нарушая кальциевый гомеостаз и окислительный метаболизм, тяжелые металлы повреждают клетки со всех сторон. Эти изменения затрагивают весь организм - приводят к опухолям, аллергиям, снижению жизненной силы и большинству заболеваний.

2 Материалы и методы

2.1 Объект исследования

Работу проводили на базе Сибирского Федерального Университета, кафедры медицинской биологии и лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии ГУ НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН.

Объект исследования – кровь и печень лабораторных мышей из вивария Сибирского Федерального Университета, кафедры медицинской биологии.

Контрольная и экспериментальная группы формировались из 3-х месячных самок, весом 35 ± 3 г. Экспериментальная группа составляла 10 мышей и была перевезена в город Норильск. Срок пребывания в Норильском промышленном районе составил 6 месяцев. Мыши находились в стандартных условиях с естественной сменой освещения, с соблюдением стандартного рациона питания. У всех животных был свободный доступ к пище и воде. Кроме того, два раза в день животным проветривали помещение и поили нефilterованной водой.

У мышей контрольной и экспериментальной группы вырезали печень, кровь забирали пункцией сердца. Полученную гепаринизированную кровь опытных и контрольных животных центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 минут для осаждения форменных элементов.

2.2 Методы исследования

2.2.1 Методика приготовления мазка крови

На чистое обезжиренное предметное стекло помещают небольшую каплю крови. Шлифованным краем камеры Горяева, прикоснувшись к предметному стеклу перед каплей крови, под углом 45° продвигают его до соприкосновения с кровью.

Ожидают, до тех пор, пока кровь расплывется по всему ребру камеры Горяева, и легким быстрым движением ведут его справа налево до тех пор, пока не будет размазана вся капля. Капля крови должна быть небольшой и такого размера, чтобы весь мазок поместился на предметном стекле, не доходя 1—1,5 см до его края. Размазывание не прекращают и не отнимают стекло, пока кровь полностью не распределится по стеклу. Нельзя также сильно нажимать на стекло, потому как большинство клеток может повредиться. Мазок считается хорошим, если он тонкий, розоватого цвета и оканчивается «кисточкой».



Рисунок 3 - Приготовление мазка крови

О том, что мазок слишком толстый говорит густо-розовое и красное окрашивание. Такой мазок не пригоден для счета, потому как клетки невозможно дифференцировать.

После приготовления мазки быстро сушат на воздухе до исчезновения влажности. При медленном высыхании может изменяться морфология клеток. Затем мазок подписывают.

Принцип метода окрашивания мазка крови.

Методы окраски мазков основаны главным образом на химическом сродстве основных частей клеток к определенным анилиновым краскам и в меньшей степени на их физических свойствах. Цитоплазма одних клеток, будучи щелочной, имеет сродство к кислым краскам, выявляя оксифильные элементы крови. Цитоплазма других клеток, содержащих базофильные и нейтрофильные субстанции, поглощает и кислые, и основные краски. Ядра, содержащие в значительном количестве нуклеиновую кислоту, связывают главным образом основные краски.

К основным гематологическим краскам относятся метиленовый синий и его производные— азур I (метиленазур) и азур II (смесь равных частей азура I и метиленового синего), к кислым — водорастворимый желтый эозин. Азур-эозиновые смеси красок обладают высокой чувствительностью к реакции воды и поэтому применяемая для приготовления красителей и для смывания их дистиллированная вода должна иметь нейтральную реакцию, т. е. рН 7,0. При кислой реакции воды клетки долго не прокрашиваются и имеют красный оттенок. При щелочной реакции воды эритроциты окрашиваются в серовато-синий цвет, а ядра и цитоплазма клеток — в очень темные цвета.

Мазки окрашивают экспресс методом краской Романовского по принципу Алексеева. Мазки сушат, выкладывают на мостик из двух стеклянных палочек. Наносят глазное пипеткой 6-10 капель краски, распределяя ее равномерно при помощи этой же пипетки. Затем, через 30 сек, чистой пипеткой добавляют 6-10 капель теплой дистиллированной воды (для ускорения окраски). Покачивая предметное стекло, перемешивают краску с водой. Смывают краску через 3 мин дистиллированной водой и сушат мазок при помощи фильтровальной бумаги. При данном методе окраски лейкоциты не изменяются, а эритроциты частично гемолизируются.

2.2.2 Подсчет лейкоцитарной формулы под микроскопом

Лейкоцитарную формулу с помощью иммерсионной системы микроскопа. Так как разные виды лейкоцитов неравномерно располагаются по препарату (моноциты и нейтрофилы — больше вдоль верхнего и нижнего продольного края препарата, а лимфоциты — ближе к его центру), подсчет лейкоцитарной формулы осуществляют, пользуясь следующими методическими указаниями. Под малым увеличением микроскопа находят край мазка крови вблизи образовавшейся щеточки. У продольного края мазка наносят каплю иммерсионного масла, после чего осторожно опускают объектив (x90) до соприкосновения с маслом, затем объектив приподнимают на 1 мм. При этом силы поверхностного натяжения удерживают масло в контакте с линзой. После этого фиксируют поле зрения, медленно опуская объектив до появления контуров клеток. Для окончательной фокусировки использовали микровинт.

Двигаясь по мазку, исследуют лейкоциты в каждом поле зрения. При движении по мазку крови пересекают мазок по схеме, представленной на рисунке 4.

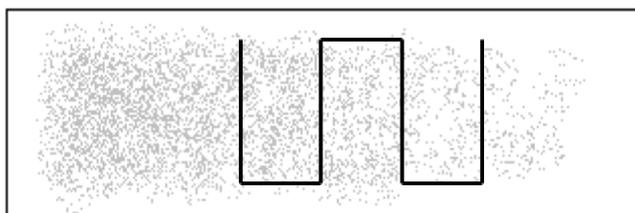


Рисунок 4 - Схема движения по мазку крови при исследовании морфологии лейкоцитов

В поле зрения (рисунок 5) основную площадь занимают безъядерные эритроциты и один или несколько лейкоцитов с ядрами. Лейкоциты крупнее эритроцитов по размерам; ядра окрашены в фиолетовый цвет.

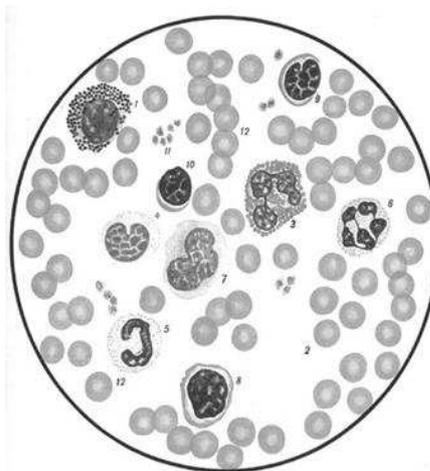


Рисунок 5- Морфологические особенности лейкоцитов крови

1 - базофил; 2, 12 - эритроциты; 3 - эозинофил; 4, 7 - моноциты; 8, 9, 10 - лимфоциты; 5 - палочкоядерный нейтрофил; 6 - сегментоядерный нейтрофил; 11 - тромбоциты.

Клетки считают до 50%. Оставшиеся 50% досчитывают на другой стороне препарата. Так же, как описано выше, при продвижении мазка подсчитывают все лейкоциты, обнаруживаемые в поле зрения. Подсчет заканчивают на 100 лейкоцитах. Получившиеся результаты переводят в процентное количество лейкоцитов каждого типа.

Таблица 2.1 - Показатели лейкоцитарной формулы крови человека

Нейтрофилы	Нейтрофилы	Эозинофилы	Базофилы	Лимфоциты	Моноциты
Палочкоядерные	Сегментоядерные				
1-6 %	45-70%	0 – 5 %	0 – 1%	18 – 40%	2 – 9%

Таблица 2.2 - Показатели лейкоцитарной формулы крови белой мыши

Нейтрофилы	Нейтрофилы	Эозинофилы	Базофилы	Лимфоциты	Моноциты
Палочкоядерные	Сегментоядерные				
1-5 %	13-30%	0 – 4 %	0 – 2%	60 – 78%	2 – 5%

2.2.3 Приготовление гомогената печени

Печень извлекают у мыши сразу после вскрытия. На электронных весах отвешивают 0,375г печени. Помещают в ручной гомогенизатор со стеклянным пестиком. Растирают до образования гомогената с добавлением 2 мл дистиллированной воды. Затем добавляют еще 4 мл воды. Таким образом, получалось разбавление в 16 раз. Полученный гомогенат центрифугируют 10 минут при 3000 об./мин. Измерения проводят в экстракте [37].

2.2.4 Определение содержания гемоглобина

Содержание гемоглобина (Hb) определяют унифицированным гемиглобинцианидным методом с использованием набора реактивов фирмы «Агат-Мед».

Принцип метода: Hb крови при взаимодействии с железосинеродистым калием (красная кровяная соль) окисляется в Met-Hb, образующий с ацетонциангидрином гемиглобинцианид (цианметгемоглобин), оптическая плотность которого при 540 нм пропорциональна концентрации Hb в образце крови. Содержание Hb в опытных образцах выражают в граммах на литр упакованных эритроцитов.

Ход работы: к 5 мл трансформирующего раствора добавляют 0,02 мл крови (разведение в 251 раз) или гемолизата (разведением не более, чем в 10 раз), хорошо перемешивают. Определение проводят через 10 минут против холостой пробы (трансформирующего раствора), окраска устойчива в течение не менее 1 часа.

При использовании спектрофотометра определение оптической плотности проводят при длине волны 540 нм в кювете с толщиной слоя 1 см. Содержание гемоглобина рассчитывают по формуле:

$$Hb(g/l) = D_{540} \times 367,7 \quad (1)$$

При использовании фотоколориметра определение проводят в диапазоне длин волн 500-560 нм (зелёный светофильтр). Калибровочный раствор гемоглобина обрабатывают так же, как и пробу цельной крови. Расчёт содержания гемоглобина производят по формуле :

$$Hb(\text{г/л}) = \frac{D_o}{D_x} \times 120, \quad (2)$$

где: Hb – содержание гемоглобина в опытной пробе, г/л;

D_o – оптическая плотность опытной пробы;

D_x – оптическая плотность калибровочной пробы;

120 – содержание гемоглобина в калибровочном растворе, г/л.

2.2.5 Определение содержания белка

Содержание белка определяют биуретовым методом с использованием реактивов фирмы «Агат-Мед».

Принцип метода: ионы меди в щелочной среде взаимодействуют с пептидными связями белков сыворотки крови с образованием комплекса красного цвета, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации общего белка и измеряется фотометрически при длине волны 540 (500–560) нм.

В пробирки внесут реактивы по схеме указанной в таблице 2.3.

Таблица 2.3- схема внесения реактивов в пробирки для определения общего белка в гомогенате печени

Отмерить, мл	Опытная проба	Калибровочная проба	Контрольная проба
Гомогенат печени	0,10	-	-
Калибровочный раствор общего белка	-	0,10	-
Вода дистиллированная	-	-	0,10
Рабочий раствор биуретового реагента	5,00	5,00	5,00

Содержимое пробирок тщательно перемешивают, избегая образования пены, инкубируют при комнатной температуре (+18–25° С) в течение 30 минут, после чего измеряют величину оптической плотности калибровочной и опытных проб против контрольной (холостой) пробы при длине волны 540 (500–560) нм в кювете с толщиной поглощающего свет слоя 1 см.

Концентрацию общего белка рассчитывают по формуле:

$$C = E_o / E_k \times 60, \quad (3)$$

где: С – концентрация общего белка в опытной пробе, г/л;

E_o – оптическая плотность опытной пробы, ед.опт.плотн.;

E_k – оптическая плотность калибровочной пробы, ед.опт.плотн.;

60 – концентрация общего белка в калибровочном растворе, г/л.

2.2.6 Билюминесцентное определение активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в эритроцитах и гомогенате печени

Билюминесцентное определение активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ проводится по ранее разработанным методикам [38]. Для этого суспензию выделенных эритроцитов после однократного замораживания-размораживания дополнительно эритроциты разрушат путем осмотического лизиса с добавлением дистиллированной воды (1:5 по объему) и 1,0-2,0 мМ дитиотреитола. Затем производили непосредственное определение активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ. Для этого в 150 мкл инкубационной смеси, содержащей соответствующий субстрат и кофактор, вносят 50 мкл суспензии разрушенных эритроцитов или гомогенат печени. Конкретные значения концентраций субстратов и кофакторов, а также рН среды для определяемых ферментов представлены в таблице 2.4. Кроме того следует отметить, что в инкубационную смесь определения активности НАДФИЦДГ и НАДИЦДГ дополнительно добавляют АДФ в концентрациях

2,15 и 1,3 мМ соответственно. В среду инкубации для определения уровней НАДНГДГ и НАДФНГДГ дополнительно вносят NH_4Cl в концентрации 5,0 мМ, а для определения ГР – ЭДТА в концентрации 0,5 мМ.

После инкубации исследуемых проб при 37°C в течение 30 минут (для ферментативных реакций с восстановлением НАД(Ф)+) или 5 минут (для реакций с окислением НАД(Ф)Н) к 200 мкл пробы добавляют 50 мкл флавинмононуклеотида (ФМН) в концентрации $1,5 \times 10^{-5}\text{M}$, 50 мкл 0,0005% миристинового альдегида и 10 мкл ферментативной системы НАД(Ф)Н: ФМНоксидоредуктаза-люцифераза (все реактивы биолюминесцентной системы разведены в 0,1 М K^+, Na^+ -фосфатном буфере с pH 7,0). После смешивания биолюминесцентных реактивов и инкубационной пробы с помощью биолюминометра “БЛМ-8803” (сконструирован в СКТБ “Наука”, г. Красноярск) производят измерение свечения.

Ферментативная система НАД(Ф)Н: ФМНоксидоредуктаза-люцифераза изготовлена из очищенных методами ионообменной хроматографии и гель-фильтрации люциферазы из *Photobacterium leiognathi* и оксидоредуктазы из *Vibrio fischeri* в Институте биофизики СО РАН г.Красноярска.

Необходимо учесть, что в разрушенных клетках присутствует некоторое количество субстрата для работы исследуемых ферментов. Поэтому определяют показатели, названные «субстратный фон ферментов».

Определяют «субстратный фон ферментов» при таких же условиях, что и для вышеперечисленных дегидрогеназ, однако в инкубационную пробу вместо соответствующего субстрата добавляют буфер. В результате измерения свечения на биолюминометре получаем относительные значения активности исследуемых ферментов. Для получения абсолютных значений активности нужно построить график зависимости интенсивности биолюминесценции от концентрации НАД(Ф)Н (калибровочный график).

Таблица 2.4 - Концентрация субстратов, кофакторов и показатели pH среды для определения активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в эритроцитах и гепатоцитах биолюминесцентным методом

Фермент	Субстрат – мМ	Кофактор – мМ	pH буфера
Г6ФДГ	Г6Ф – 1,5	НАДФ – 0,025	9,8
Г3ФДГ	Г3Ф – 0,5	НАД – 0,35	9,8
ЛДГ	Лактат – 2,0	НАД – 0,50	9,0
МДГ	Малат – 2,0	НАД – 2,50	9,8
НАДФМДГ	Малат – 7,5	НАДФ – 0,375	9,8
НАДФГДГ	Глутамат – 0,5	НАДФ – 1,65	9,8
НАДГДГ	Глутамат – 8,7	НАД – 8,10	9,8
НАДИЦДГ	Изоцитрат – 5,0	НАД – 5,0	7,8
НАДФИЦДГ	Изоцитрат – 1,375	НАДФ – 0,075	7,4
НАДНЛДГ	Пируват – 0,25	НАДН – 0,005	7,0
НАДНМДГ	Оксалоацетат – 0,5	НАДН – 0,005	7,0
ГР	GSH – 0,5	НАДФН – 0,0025	7,4
НАДФНГДГ	Оксоглутарат – 100	НАДФН – 0,0025	7,4
НАДНГДГ	Оксоглутарат – 100	НАДН – 0,0025	7,0

Примечание: среды с pH 9,0 и 9,8 подготовили на Трис-НСl буфере; с pH 7,0, 7,4 и 7,8 – на K⁺,Na⁺-фосфатном буфере.

Для этого 200 мкл стандартного раствора НАД(Ф)Н в диапазоне 10⁻⁹ – 10⁻⁴ М вносили в кювету биолюминометра, содержащие биолюминесцентные реактивы в концентрациях указанных выше, после чего производилось измерение интенсивности биолюминесценции. В связи с широким диапазоном pH буферов, используемых для определения дегидрогеназной активности, а также pH-зависимостью биолюминесценции ферментативной системы, калибровочные графики строятся для каждого pH буфера.

Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ рассчитывают по формуле :

$$A = \frac{\Delta[C] \times V}{T}, \quad (4)$$

где: А-активность фермента;

$\Delta[C]$ – разница концентраций НАД(Ф)Н в пробах “фермент” и “фон фермента”;

V – объем пробы в миллилитрах;

T – время инкубации.

Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ выражают в ферментативных единицах на 10^4 клеток, где 1 Е=1 мкмоль/мин [39]. В связи с широким диапазоном рН буферов, используемых для определения дегидрогеназной активности, а также рН-зависимостью биолюминесценции ферментативной системы, калибровочные графики строятся для каждого рН буфера.

Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ из эритроцитов в пересчете на гемоглобин рассчитывают по формуле:

$$A(\text{Hb}) = A/\text{Hb} ,$$

где: А(Нб)- активность фермента в пересчете на гемоглобин

A – активность фермента;

Hb – содержание гемоглобина.

Активность фермента выражают в единицах в мин на грамм Hb.

Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ из гомогената печени в пересчете на белок рассчитывают по формуле:

$$A(\text{бел.}) = A/C_{\text{бел}} , \quad (5)$$

где: А(бел.)- активность фермента в пересчете на белок;

A- активность фермента;

$C_{\text{бел}}$ - количество белка в пробе.

2.2.7 Статистические методы исследования

В программе MS Excel после получения результатов исследования строится база данных, на основе которой при помощи пакета прикладной программы “Statistica 7,0” производится статистический анализ. Для всех данных определяют медиану (Me) и интерквартильный разброс в виде подсчета 25- (C25) и 75-перцентилей (C75). Статистическую достоверность гипотезы двух выборок проводят непараметрическим методом с критерием Манна-Уитни [40]. По результатам статистики строят таблицы и используют в графиках.

Из текста ВКР изъяты результаты интеллектуальной деятельности, которые имеют потенциальную коммерческую научную ценность в силу неизвестности их третьим лицам.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АТФ - аденозин-5'-трифосфат
АДФ - аденозин-5'-дифосфат
ГЗФДГ - глицерол-3-фосфатдегидрогеназа
Г6ФДГ - глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа
ГДГ - глутаматдегидрогеназа
ГР - глутатионредуктаза
ЛДГ - лактатдегидрогеназа
Обр. ЛДГ - обратная реакция лактатдегидрогеназы (анаэробная)
Обр. МДГ - обратная реакция малатдегидрогеназы
Обр. НАДГДГ - обратная реакция НАД-зависимой глутаматдегидрогеназы
ПДК – предельно допустимая концентрация
МДГ - малатдегидрогеназа
НАД⁺ - никотиамидадениндинуклеотид окисленный
НАДН - никотиамидадениндинуклеотид восстановленный
НАДФ⁺ - никотиамидадениндинуклеотидфосфат окисленный
НАДГДГ - НАД-зависимая глутаматдегидрогеназа
НАДИЦДГ - НАД-зависимая изоцентратдегидрогеназа
НАДФИЦДГ - НАДФ-зависимая изоцетратдегидрогеназа
НАДФМДГ - НАДФ-декарбоксилирующая малатдегидрогеназа (малик-вермент)
НАДФГДГ - НАДФ-зависимая глутаматдегидрогеназы
НАДН-ГДГ - НАДН-зависимая реакция глутаматдегидрогеназы
НАДН-ЛДГ - НАДН-зависимая реакция лактатдегидрогеназы(анаэробная)
НАДН-МДГ - НАДН-зависимая реакция малатдегидрогеназы
НАДФН-ГДГ - НАДФ-зависимая реакция глутаматдегидрогеназы
НАДФН - никотиамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный
Нв - гемоглобин

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Толстов, В. А. Летопись Норильска / В.А. Толстов. - Норильск: Апекс, 2011. – С. 24-40.
2. Мониторинг влияния выбросов ЗФ ОАО «ГМК «Норильский никель» на окружающую среду: отчет о НИР / ФБУ «ЦЛАТИ по СФО»; рук. Березова Л. Е.; исполн.: И. С. Белавин, Е.В. Андреев, П. А. Крафт, А. Н. Мельников, В.Н. Карпов.– Новосибирск, -2015.- С. 13-37.
3. Минигалиева, И. А. Некоторые токсикодинамические и токсикокинетические особенности комбинированной субхронической интоксикации шестивалентным хромом и никелем / Киреева Е. П., Григорьева Е. В. // Медицина труда и промышленная экология - 2014.-Т. 5, № 6. - С.35-39.
4. Мотузова, Г. В. Химическое загрязнение биосферы и его экологические последствия/ Г.В. Мотузова, Е.А. Карпова. - М.: Изд-во МГУ, 2013. - 304 с.
5. Звездин, В. Н. Гигиеническая оценка аэрогенного воздействия никеля на процессы адаптации у детей / Звездин В. Н.// Здравоохранение Российской Федерации, - 2013. - № 6.- С.41-43.
6. Освоение норильских месторождений [Электронный ресурс]: Официальный сайт Норильского никеля, - Электрон. текстовые дан. - Режим доступа: <http://www.nornik.ru/>.
7. Львов, А. П. Норильск / А. П. Львов. - Красноярск : Кн. изд-во, 1977. – 173 с.
8. О состоянии и охране окружающей среды в Красноярском крае за 2015 год: гос. доклад / Мин-во природных ресурсов и экологии Красноярского края; рук. Шефер В. В., Куликова В. В.; исполн. Толмачев В. А. [и др.]. - Красноярск, 2015. – 46 с.

9. Ярилин, А. А. Иммунология: учебник / А. А. Ярилин . - М.: ГЕОТАР, 2010. - 737с.
10. Гришкевич, Н. Ю. Особенности состояния клеточного и гуморального иммунитета у детей с различными формами ожирения /Н. Ю. Гришкевич, В. Т. Манчук, А. А. Савченко // Педиатрия. - 2005. - № 3. - С. 25-29.
11. Хаитов, Р. М. Иммунология: учебник / Р. М. Хаитов, Г. А. Игнатъева, И. Г. Сидорович. – М.: Медицина, 2000 . – 432 с.
12. Муравлева, Л.Е. Белки эритроцитов. Миниобзор / Л.Е. Муравлева и [и др.] // Успех современного естествознания. – 2013. - №4. – 4 с.
13. Агаджанян Н.А. и др. Физиология человека / Н.А.. Агаджанян [и др.]. – М.: Медицинская книга, Н.Новгород: Издательство НГМА, 2003. – 528 с.
14. Толпыгина, О. А. Роль глутатиона в системе антиоксидантной защиты / О.А. Толпыгина // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2013. - №2-2. – С.178-180.
15. Масловская, А. А. Влияние однократного введения этанола на некоторые показатели метаболизма печени крыс / А. А. Масловская, В. В. Климович, О. И. Кузнецов, А. В. Булат // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2011. - № 3(19). – С 29-30.
16. Ленинджер, А. Основы биохимии: в 3-х т / А Ленинджер. - М.: Мир, 1985. - Т. 2. - 368 с.
17. Мецлер, Д. Б. Биохимия: в 3-х т / Д.Б. Мецлер.- В 3-х т. – М.: Мир, 1980.- Т.2. - С. 154-158.
18. Акопова, Ю. С. Особенности состояния иммунного статуса и метаболизма лимфоцитов крови лиц, проживающих в экологически неблагоприятных районах города Красноярска: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.16 / Акопова Юлия Семеновна. – Красноярск, 2006. – 24 с.

19. Северин, Е. С. Биохимия / Е.С. Северин, Т. Н. Алейникова, Е. О. Осипов – М: Медицина, 2000. – 367 с.
20. Савко, Л. В. Универсальный медицинский справочник. Все болезни от А до Я / Л. В. Савко. – Санкт-Петербург: Питер, 2009. – 473 с.
21. Ford, M. D. Clinical Toxicology/ M. D. Ford, K. A. Delaney, L. J. Ling, T. Erickson. - Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2001. - 156 p.
22. Доценко, О. И. Активность супероксиддисмутазы и каталазы в эритроцитах и некоторых тканях мышц в условиях низкочастотной вибрации / О. И. Доценко, В. А. Доценко, А. М. Мищенко // Физика живого. – 2010. – Т.18, №1. – С. 2-4.
23. Fonovich de Schroeder, M. The effect of Zn on glucose 6-phosphate dehydrogenase activity from *Bufo arenarum* toad ovary and alfalfa plants/ M. Fonovich de Schroeder. - Ecology and Environmental. -2005. - №7. - P.123-132
24. Karthikeyan, J. Effect of cadmium on lactate dehydrogenase isoenzyme, succinate dehydrogenase and $Na^{+}-K^{+}-ATPase$ in liver tissue of rat / J.Karthikeyan , G. Bavani // Journal of Environmental Biology. - 2012. - № 6. - P.895-898.
25. Бедняков, Д. А. Влияние ионов металлов на ферменты мембранного пищеварения белуги, стерляди и их гибридов – бестера и стербела / Д. А. Бедняков, Л. А. Неваленная, В. Ю. Новинский // Вестник Астраханского государственного технического университета. Рыбное хозяйство. - 2012. - №2. - 52 с.
26. Viegas-Crespo, A. M. Hepatic elemental contents and antioxidant enzyme activities in Algerian mice (*Mus spretus*) inhabiting a mine area in central Portugal / A.M. Viegas-Crespo. - The Science of the Total Environment, 2003. - P.101–109.
27. Хамбеков, Р. С. Оценка содержания диоксида серы в атмосферном воздухе в окрестностях села Октябрьское Ульяновской области /Р. С. Хамбеков // Бюллетень медицинских интернет-конференций. -2013. - Т. 2, №4. - С. 206-211.

28. Выбросы загрязняющих веществ в атмосферу в городах и районах Красноярского края [Электронный ресурс]: Федеральный портал. – Электрон. Текстовые дан. - Красноярск, 2014. - Режим доступа: <http://protown.ru/>.

29. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение прикладных программ Statistika /О. Ю. Реброва. - М:Медиа Сфера, 2003. – 305 с.

30. Barceloux, D.G. Cobalt/ Barceloux D.G// J Toxicol Clin Toxicol. - 1999. - Vol. 37. - № 5. - P. 201 - 206.

31. Fawell, J.K. Chlorinated drinking-water; chlorination by-products; some other halogenated compounds; cobalt and cobalt compounds/ J.K. Fawell [et al.]. – Lyon: International Agency for Research on Cancer Working Group, 1991. – 544 p.

32. Goldoni, M. Exhaled breath condensate as a suitable matrix to assess lung dose and effects in workers exposed to cobalt and tungsten/ Goldoni M., Catalani S., De Palma G. et al. -Environ Health Perspect., 2004. - Vol. 112. - P.1293-1298.

33. Palmes, E.D. Inhalation toxicity of cobalt hydrocarbonyl/ E.D. Palmes, N. Nelson, S. Laskin, M. Kuschner. -Am Ind Hyg Assoc J, 1959. - Vol. 20. - P. 453-468.

34. О санитарно-эпидемиологической обстановке в Красноярском крае в 2012 году: отчет о НИР / Управление Роспотребнадзора по Красноярскому краю; рук. Березова Л. Е.; исполн.: И. С. Белавин, Е.В. Андреев, П. А. Крафт, А. Н. Мельников, В.Н. Карпов. - Красноярск, 2012. – 105 с.

35. Ревич, Б. А. Экологическая эпидемиология: учебник для высш.учеб. заведений / Б. А. Ревич, С. Л. Авалиани, Г. И. Тихонова – М.: Академия, 2004. – 384 с.

36. Линева, А. Б. Физиологические показатели нормы животных / Линева А. Б. - М.: Аквариум, 2001. – 256 с.

37. Меньшикова, В. В. Лабораторные методы исследования в клинике: справочник / В. В. Меньшикова – М.:Медицина. – 1987. – 364 с.

38. Савченко, А.А., Высокочувствительное определение активности дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови биолюминесцентным методом / А. А. Савченко, Л. Н. Сунцова // Лаб. дело. - 1989. - № 11. - С. 23-25.
39. Березов, Т. Т. Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б.Ф. Коровкин. - М.: Медицина, 1998. - 704 с.
40. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica /О. Ю. Реброва. – М.: Медиасфера, 2003. – 305 с.
41. Luo, C. NADH-tetrazolium-coupled sensitive assay for malate dehydrogenase in mitochondria and crude tissue homogenates / Luo C. [et al.] // J. Biochem. Biophys. Methods. - 2006. - Vol. 68, №2. - P. 101-111.
42. Зубарева, О. Н. Зонирование ландшафтов, подверженных техногенному воздействию выбросов Норильского горно-металлургического комбината / О. Н. Зубарева, Л. Н. Скрипальщикова, Н. В. Грешилова, В. И. Харук // Экология. - 2003 . - № 6 . - С. 415-419.
43. Шульга, А. И. Эпидемиологические особенности заболеваемости инфекциями верхних дыхательных путей населения в регионах с разной антропогенной нагрузкой / А. И. Шульга, Е. А. Васильев, П. Н. Скачков // Пульмонология - 2004. - № 3. - С.43-48.
44. Catcott, E. J. Air pollution. Effect of air pollution on animals: monograph / E.J. Catcott. -Geneva: World Health Organization, 1961. – 221 p.
45. Kotin, P. O. The experimental induction of pulmonary tumors in Strain A mice after their exposure to an atmosphere of ozonized air / P. O. Kotin., H. L. Falk. – Philadelphia, 1956. – P. 910-917.
46. Xu, X. Effect of Early Particulate Air Pollution Exposure on Obesity in Mice: role of p47phox / Z. Yavar [et al.] // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. - 2010. - №8. - 12 p.
47. Семенова, О. А. Активность некоторых дегидрогеназ в тканях черноморских мидий в условиях действия хлоридов тяжелых металлов / О.

А. Семенова // Вестник Харьковского национального университета имени В. Н. Каразина. Серия: Биология . - 2013. - № 1056. - С. 33-36.

48. Савченко, А. А. Основы клинической иммунометаболомики А. А. Савченко, А.Г. Борисов. - Новосибирск: Наука, 2012. - 263 с.

49. Парфенова, И. В. Строение активного центра, физико-химические и регуляторные свойства малатдегидрогеназы у представителей различных экологических групп бактерий: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.01.04/ Парфенова Ирина Владимировна. – Воронеж, 2011. - 24 с.

50. Шихалиева. К. Д. Малатдегидрогеназная ферментная система бактерий *Rhodobacter sphaeroides*: очистка, физико-химические свойства, метаболитная и экспрессионная регуляция: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.01.04 / Шихалиева Ксения Джамильевна. - Воронеж, 2011. - 29 с.

51. Аксенова, М.Е. Тяжелые металлы: механизмы нефротоксичности / М.Е. Аксенова // Нефрология и диализ. – 2000. - Т. 2, №1. – С. 46-75.

52. Куценко, С.А. Основы токсикологии: учеб. пособие для вузов / С.А. Куценко. – Санкт-Петербург: Фолиант, 2003. – Т.4 . - 119 с.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

Е.И. Шинцакова Е.И. Шинцакова

подпись: должность, фамилия

« 28 » июня 2016г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 - Биология

Влияние техногенной нагрузки города Норильска на метаболизм
эритроцитов и гепатоцитов мышей

Руководитель

Ю.С. Аюпова
подпись, дата

доцент, к.б.н.
должность, ученым степеням

Ю.С. Аюпова
инициалы, фамилия

Выпускник

Лескова И.Б.
подпись, дата

И.Б. Лескова
инициалы, фамилия

Красноярск 2016