

МЕТАБОЛІЧНІ ПОКАЗНИКИ В ОРГАНІЗМІ ЩУРІВ ЗА УМОВ ІНТОКСИКАЦІЇ ВАЖКИМИ МЕТАЛАМИ

І.В. Калінін, Н.М. Данченко, Б.О. Цудзевич

Київський національний університет ім. Тараса Шевченка

Вступ

Посилення антропогенного впливу і техногенного забруднення призводить до надлишку хімічних елементів у навколишньому середовищі. Надлишкові концентрації важких металів у природі негативно впливають на екологічний стан довкілля, що може спричинити порушення біохімічних та фізіологічних процесів, які відбуваються у живих організмах [2,7]. Це становить реальну загрозу для всього живого й може призвести до збільшення мутагенного тиску на людську популяцію. У свою чергу тотальне забруднення атмосферного повітря, ґрунту, питної води та продуктів харчування мутагенами може стати причиною різноманітних патологій [8].

Відомо, що важкі метали при надходженні до організму можуть викликати ряд метаболічних зрушень, переважно окисно-відновних процесів. Утворення біокомплексів металів з різноманітними компонентами клітини може призвести до руйнування мембран, а також пригнічення активності різноманітних ферментів [10].

Цитотоксичність металів обумовлена трьома взаємопов'язаними механізмами: посиленням перекисного окиснення ліпідів як за рахунок зниження антиоксидантного захисту клітини, так і за рахунок безпосередньо прооксидантної активності деяких металів; пригніченням мітохондріального дихання внаслідок зміни мембранного потенціалу мітохондрій та порушення активності ферментів циклу Кребса і дихального ланцюга; порушенням кальцієвого гомеостазу клітини за рахунок зміни внутрішньоклітинного потоку кальцію, заміни кальцію на специфічних рецепторах з подальшою активацією кальційзалежних ферментів.

Більшість важких металів мають високу біологічну активність [3], однак окремі з них зумовлюють токсичний вплив навіть за незначного вмісту в організмі. Вони здатні кумулюватися у тканинах тварин і трофічним ланцюгом потрапляти в організм людини у не-

безпечних кількостях. Наслідки довготривалої дії невисоких рівнів важких металів виявляються в організмі людини і тварин повільно і погано розпізнаються.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана відповідно до плану науково-дослідних робіт Київського національного університету імені Тараса Шевченка і є фрагментом наукових тем Навчально-наукового центру «Інститут біології»: «Визначення біохімічних, генетичних, імунологічних та цитоморфологічних маркерів розвитку патологічних станів організму з метою розробки засобів направленої корекції і профілактики» (№ держреєстрації 0106U005750) та «Механізми реалізації адаптаційно-компенсаторних реакцій організму за умов розвитку різних патологій» (№ держреєстрації 0111U004648).

Метою роботи було дослідження метаболічних показників в організмі щурів за умов інтоксикації важкими металами (Cu, Zn, Cd, Pb).

Матеріали та методи дослідження

Дослідження проводили на білих нелінійних щурах-самцях одного віку, масою 180-200 г., яких утримували у звичайних умовах віварію. Було утворено п'ять груп тварин: перша – інтактні (контроль), друга – тваринам перорально вводили розчин міді сульфату в дозі 3 мг/кг, що становить 1/10 від ЛД₅₀, третя – щурам перорально вводили розчин цинку сульфату в дозі 2 мг/кг, що становить 1/20 від ЛД₅₀, четверта – тваринам перорально вводили розчин кадмію сульфату в дозі 1,5 мг/кг, що становить 1/30 від ЛД₅₀, п'ята – тваринам перорально вводили розчин свинцю азотнокислого в дозі 1,7 мг/кг, що становить 1/50 від ЛД₅₀. Інтоксикацію проводили впродовж 14 діб, потім щурів декапітували під ефірним наркозом та відбирали кров і печінку для подальших досліджень. Робота проводилась відповідно до конвенції Ради Європи щодо захисту тварин, яких використовують у наукових цілях.

Метаболіти циклу трикарбонових кислот в крові (малат, оксалоацетат, α -кетоглутарат) визначали ферментативним методом. [1]. Біохімічний аналіз крові (активність лужної фосфатази (ЛФ, КФ 3.1.3.1), аланінамінотрансферази (АлАТ, КФ 2.6.1.2), аспартамінотрансферази (АсАТ, КФ 2.6.1.1), гамаглутамілтранспептидази (γ -ГТП, КФ 2.3.2.2), лактатдегідрогенази (ЛДГ, КФ 1.1.1.27), холінестерази (ХЕ, КФ 3.1.1.8), загальної α -амілази (КФ 3.2.1.1), вміст білірубину (загального і прямого), креатиніну, сечовини, глюкози, альбуміну, загального білка, холестерину, тригліцеридів, хлоридів,

магнію, фосфору неорганічного, кальцію, натрію та калію) проводили за допомогою напівавтоматичного біохімічного аналізатора Microlab 300 (Нідерланди). Вміст сульфгідрильних і дисульфідних груп у білковій фракції крові та печінці визначали методом Соколовського [4–6]. Результати досліджень піддавали статистичному аналізу. Достовірність результатів визначали, використовуючи критерій Стьюдента. Статистичні розрахунки проводили з використанням програми «Microsoft Excel 2007».

Отримані результати та їх обговорення

Досліджені показники інтермедіатів циклу трикарбонових кислот крові щурів за умов інтоксикації важкими металами наведено в таблиці 1.

Таблиця 1

Інтермедіати циклу трикарбонових кислот в крові щурів за умов інтоксикації важкими металами, мкмоль/мл ($M \pm m$, $n=8$)

Показник	Інтактні щурі	Інтоксиковані щурі			
		Cu	Zn	Cd	Pb
1	0,033±0,001	0,027±0,001*	0,026±0,001*	0,032±0,001	0,027±0,01*
2	0,081±0,002	0,103±0,01*	0,102±0,01*	0,108±0,02*	0,106±0,02*
3	0,055±0,001	0,074±0,002*	0,073±0,001*	0,080±0,003*	0,078±0,002*

Примітка: 1 – малат, 2 – оксалоацетат, 3 – α -кетоглутарат; * $p \leq 0,05$ порівняно з інтактними щурами.

Нами встановлено, що при інтоксикації іонами міді збільшується вміст оксалоацетату і α -кетоглутарату на 28% і 36%, відповідно у порівнянні з контрольною групою тварин. Разом з тим, інтоксикація міддю знижує вміст малату на 19%, порівняно з інтактною групою щурів. При інтоксикації іонами цинку збільшується вміст оксалоацетату (на 26%) і α -кетоглутарату (на 34%), разом з тим, відмічається зменшення вмісту малату на 21%. Інтоксикація іонами кадмію впливала на досліджувані метаболіти ЦТК наступним чином: вміст оксалоацетату і α -кетоглутарату збільшився на 34% і 46%, відповідно, а вміст малату залишався без змін, порівняно з контролем. В результаті інтоксикації іонами свинцю встановлено збільшення вмісту оксалоацетату (на 32%) і α -кетоглутарату (на 42%) та зменшення вмісту малату (на 17%), порівняно з інтактними щурами. Збільшення вмісту оксалоацетату і α -кетоглутарату у крові інтоксикованих щурів може свідчити, ймовірно, про зниження процесів окиснення в циклі трикарбонових кислот, а також про підвищення інтенсивності про-

цесів глюконеогенезу. Зниження вмісту малату в крові дослідних щурів може бути зумовлено механізмами, зв'язаними з порушенням енергозабезпечення клітин, а також, можливо, з недостатньою інтенсивністю реакцій декарбокซิлювання пірувату. Отримані нами результати узгоджуються з відомими даними про особливості метаболічних процесів при інтоксикації важкими металами, зокрема підвищення вмісту глюкози в крові [11].

Біохімічний аналіз крові щурів за умов впливу ксенобіотиків на метаболічні процеси в організмі наведено в таблиці 2.

Дослідження активності ферментів показало активацію останніх за умов інтоксикації важкими металами у 1,5 – 2,0 рази (залежно від того чи іншого ксенобіотика), порівняно з контролем, що є важливою ознакою підтвердження патологічних процесів з урахуванням органоспецифічності ензимів.

На нашу думку, зростання активності досліджуваних ферментів може бути наслідком мобілізації захисних і компенсаторних механізмів при надходженні ксенобіотиків до організму.

Будь-який функціональний прояв живого організму забезпечується дією відповідних ферментних систем, тому зміна активності відповідних ферментів корелює з іншими досліджуваними біохімічними показниками крові. Нами встановлено, що у інтоксикованих щурів у всіх дослідних групах підвищений вміст загального і прямого білірубину, креатиніну, сечовини, глюкози, порівняно з інтактними тваринами. Разом з тим, встановлено зниження вмісту альбуміну, загального білка, холестерину і тригліцеридів також у всіх дослідних групах, по відношенню до інтактних щурів.

Згідно з результатами досліджень у інтоксикованих тварин, порівняно з інтактною групою, встановлено зміну катіонно-аніонного пулу, зокрема, виявлено тенденцію до зниження вмісту натрію і фосфору неорганічного та збільшення – хлоридів, магнію, кальцію і калію (табл. 2). Така зміна, ймовірно, зв'язана із зниженням вмісту загального білка і альбуміну, а також підвищенням вмісту органічних кислот.

Активність тіолдисульфідної системи може показувати стан антиоксидантних резервів організму, вона реагує на впливи внутрішнього та зовнішнього характеру зміною окисно-відновлювального потенціалу, який характеризує співвідношення концентрації відновлених сульфгідрильних (SH) і окиснених дисульфідних (SS) груп (тіолдисульфідний коефіцієнт (ТДК)). Відомо, що ТДК може бути інтегративним показником адаптивних можливостей організму.

Таблиця 2

**Біохімічні показники сироватки крові щурів
за умов інтоксикації важкими металами (M±m, n=8)**

Показник	Інтактні щурі	Інтоксиковані щурі			
		Cu	Zn	Cd	Pb
ЛФ, од/л	291,2±27,40	535,4±85,21*	537,3±86,11*	589,5±87,16*	554,7±86,94*
АлАТ, од/л	78,4±6,34	132,8±10,73*	135,3±11,12*	176,2±12,31*	163,6±12,11*
АсАТ, од/л	162,3±14,87	253,6±21,32*	254,9±22,41*	338,7±31,24*	285,4±23,10*
γ-ГТП, од/л	24,7±2,21	39,2±3,91*	40,5±4,17*	43,4±4,85*	41,2±4,38*
ЛДГ, од/л	323,5±32,12	650,3±54,74*	653,4±55,23*	724,6±61,14*	692,1±55,73*
ХЕ, од/л	34,3±4,91	41,4±5,13	40,1±5,03	43,2±5,94*	42,3±5,18*
Загальна α-амілаза, од/л	517,8±89,84	746,3±115,12*	749,2±123,14*	809,3±141,25*	792,1±134,21*
Білірубін загальний, мкмоль/л	3,6±0,21	3,8±0,20	3,9±0,23	4,9±0,27*	4,7±0,29*
Білірубін прямий, мкмоль/л	0,90±0,01	0,95±0,02	0,97±0,03	1,2±0,03*	1,17±0,03*
Креатинін, мкмоль/л	69,3±6,12	102,4±8,93*	104,1±9,23*	118,5±11,54*	112,6±10,15*
Сечовина, ммоль/л	6,2±0,90	11,4±1,25*	11,1±1,15*	12,9±2,32*	12,3±2,21*
Глюкоза, ммоль/л	5,1±0,70	6,7±1,10*	7,1±1,32*	8,3±1,41*	8,1±1,38*
Альбумін, г/л	42,6±3,31	33,8±2,52	34,9±2,73	31,4±2,21*	32,1±2,32*
Загальний білок, г/л	74,7±3,70	61,3±2,43	62,1±2,63	56,2±2,12*	58,4±2,21*
Холестерин, ммоль/л	1,24±0,07	0,89±0,02*	0,90±0,03*	0,76±0,01*	0,80±0,02*
Тригліцериди, ммоль/л	0,98±0,02	0,47±0,02*	0,49±0,03*	0,35±0,01*	0,40±0,02*
Хлориди, ммоль/л	86,3±7,43	106,1±9,72	105,7±9,50	112,4±10,92*	111,3±10,23*
Магній, ммоль/л	1,7±0,12	2,3±0,21*	2,4±0,24*	2,6±0,28*	2,5±0,25*
Фосфор неорганічний, ммоль/л	2,5±0,23	1,4±0,10*	1,5±0,12*	1,2±0,09*	1,3±0,10*
Кальцій, ммоль/л	1,9±0,11	2,9±0,20*	2,8±0,25*	3,5±0,37*	3,3±0,45*
Натрій, ммоль/л	144,2±12,34	127,3±11,81*	128,1±11,90*	122,3±11,15*	123,2±11,75*
Калій, ммоль/л	5,3±0,30	7,4±0,60*	7,6±0,71*	8,4±0,90*	8,1±0,84*

Примітка: * p ≤ 0,05 порівняно з інтактними щурами.

Надходження важких металів до живого організму, призводить до виникнення оксидативного стресу, який запускає сукупність взаємозалежних патологічних реакцій, що є причиною активації ПОЛ і накопичення ТБК-активних продуктів, як показано в наших попередніх роботах [9]. Такі дані узгоджуються із показниками стану тіолдисульфідної системи (табл. 3) у білковій фракції крові та печінці щурів.

Таблиця 3

Тіолдисульфідний стан крові та печінки щурів за умов інтоксикації важкими металами (M±m, n=8)

Показник	Інтактні щурі	Інтоксиковані щурі			
		Cu	Zn	Cd	Pb
Кров, мкмоль/мл					
-SH-групи	14,36±1,52	12,84±1,42	12,61±1,23	11,08±1,0*	11,76±1,21*
-SS-групи	4,53±0,63	6,05±0,82*	6,73±0,87*	10,41±0,7*	10,29±0,67*
ТДК	3,17±0,58	2,12±0,32*	1,87±0,28*	1,06±0,17*	1,14±0,19*
Печінка, мкмоль/г					
-SH-групи	19,72±1,94	15,24±1,6*	14,76±1,48*	12,87±1,29*	13,73±1,32*
-SS-групи	5,34±0,78	7,45±0,72*	7,94±0,72*	9,68±0,95*	8,79±0,64*
ТДК	3,69±0,62	2,04±0,31*	1,86±0,24*	1,33±0,19*	1,56±0,21*

Примітка: * p ≤ 0,05 порівняно з інтактними щурами.

У крові всіх дослідних груп ТДК знижувався: у другій - в 1,5 рази, у третій - в 1,7 рази, у четвертій і в п'ятій майже в 3 рази, порівняно з групою інтактних щурів. Також встановлено зниження ТДК у печінці всіх дослідних груп: у другій - в 1,8 рази, у третій - в 2 рази, у четвертій - майже в 3 рази і в п'ятій - в 2,3 рази, порівняно з контролем. Зниження тіолдисульфідного коефіцієнта вказує на збільшення концентрації вільних радикалів і виснаження антиоксидантних резервів організму, що є відображенням динаміки адаптивного процесу за умов негативної дії ксенобіотиків.

Висновки

1. Встановлено, що інтоксикація щурів іонами міді, цинку, кадмію та свинцю впливає на хід реакцій циклу трикарбонових кислот, викликаючи підвищення вмісту оксалоацетату і α-кетоглутарату та зниження вмісту малату в крові дослідних щурів.

2. Показано, що інтоксикація важкими металами щурів призводить до активації досліджуваних ферментів крові (лужної фосфата-

зи, аланін- і аспартатамінотрансфераз, γ -глутамілтранспептидази, лактатдегідрогенази, холінестерази і загальної α -амілази) по відношенню до інтактної групи.

3. Виявлено, що у інтоксикованих щурів у всіх дослідних групах підвищений вміст загального і прямого білірубину, креатиніну, сечовини, глюкози, порівняно з інтактними тваринами.

4. Встановлено зниження вмісту альбуміну, загального білка, холестерину і тригліцеридів також у всіх дослідних групах, по відношенню до інтактних щурів.

5. У інтоксикованих тварин, порівняно з інтактною групою, встановлено зниження вмісту натрію і фосфору неорганічного та збільшення – хлоридів, магнію, кальцію і калію.

6. Інтоксикація важкими металами щурів призводить до зниження вмісту – SH-груп і підвищення вмісту – SS-груп в крові та печінці всіх дослідних груп, як наслідок – зниження тиолдисульфідного коефіцієнта, що вказує на посилення процесів вільнорадикального окиснення, виснаження антиоксидантних резервів організму і конформаційні модифікації білкових молекул.

Література

1. Асатиани В.С. Ферментативные методы анализа / В.С. Асатиани. – М.: Наука, 1969. – 740 с.
2. Профілактична токсикологія та медична екологія / За заг. ред. І.М. Трахтенберга. – Київ: Авіцена, 2011. – 320 с.
3. Скальный А.В. Химические элементы в физиологии и экологии человека / А.В. Скальный. – М.: ОНИКС 21 век; Мир, 2004. – 216 с.
4. Соколовский В.В. Метод количественного определения дисульфидных групп крови обратным амперометрическим титрованием / В.В. Соколовский, Л.А. Белозерова, Р.Е. Огурцова // Лаб. дело. – 1977. – № 1. – С. 26–27.
5. Соколовский В.В. Тиоловые антиоксиданты в молекулярных механизмах / В.В. Соколовский // Вопр. мед. химии. – 1988. – № 34 (6). – С. 2–11.
6. Соколовский В.В. Тиолдисульфидное соотношение крови как показатель состояния неспецифической резистентности организма / В.В. Соколовский. – СПб., 1996. – 30 с.
7. Трахтенберг И.М. Тяжелые металлы во внешней среде: современные гигиенические и токсикологические аспекты / И.М. Трахтенберг, В.С. Колесников, В.П. Луковенко. – Минск: Наука и техника, 1994. – 286 с.
8. Цудзевич Б.О. Ксенобиотики: накопичення, детоксикація та виведення з живих організмів / Б.О. Цудзевич, О.Б. Столяр, І.В. Калінін, В.Г. Юкало. – Тернопіль, 2012. – 384 с.
9. Цудзевич Б.О. Антиоксидантна система в тканинах щурів за умов інтоксикації важкими металами / Б.О. Цудзевич, І.В. Калінін, Н.А. Петрук // Совр. проблемы токсикол. – 2012. – № 2. – С. 36–39.

10. Шафран Л.М. Металлотиионеины / Л.М. Шафран, Е.Г. Пыхтеева, Д.В. Большой. – Одесса, 2011. – 428 с.

11. Acute Effect of Cadmium-metallothionein on Glucose and Amino Acid Transport across the Apical Membrane of the Rabbit Proximal Tubule Perfused In Vitro / S. Tsuruoka, K. Sugimoto, S. Muto [et al.] // J. Pharmacology & Experimental Therapeutics. – 2000. – Vol. 292. – P. 769–777.

Резюме

Калінін І.В., Данченко Н.М., Цудзевич Б.О. Метаболічні показники в організмі щурів за умов інтоксикації важкими металами.

Досліджено вплив важких металів (Cu, Zn, Cd, Pb) на метаболічні показники організму щурів. Встановлено, що інтоксикація щурів іонами міді, цинку, кадмію та свинцю впливає на хід реакцій циклу трикарбонових кислот, призводить до активації ряду досліджуваних ферментів крові, підвищує вміст загального і прямого білірубину, креатиніну, сечовини, глюкози, хлоридів, магнію, кальцію і калію, знижує вміст альбуміну, загального білка, холестерину, тригліцеридів, натрію і фосфору неорганічного, також призводить до зниження вмісту – SH-груп і підвищення вмісту – SS-груп в крові та печінці всіх дослідних груп, і як наслідок – зниження тиолдисульфідного коефіцієнта.

Ключові слова: щурі, метаболічні показники, інтоксикація, мідь, цинк, кадмій, свинець, тиолдисульфідний стан.

Резюме

Калинин И.В., Данченко Н.Н., Цудзевич Б.А. Метаболические показатели в организме крыс при условии интоксикации тяжелыми металлами.

Исследовано влияние тяжелых металлов (Cu, Zn, Cd, Pb) на метаболические показатели организма крыс. Установлено, что интоксикация крыс ионами меди, цинка, кадмия и свинца влияет на ход реакций цикла трикарбоновых кислот, приводит к активации ряда исследованных ферментов крови, повышает уровень общего и прямого билирубина, креатинина, мочевины, глюкозы, хлоридов, магния, кальция и калия, снижает содержание альбумина, общего белка, холестерина, триглицеридов, натрия и фосфора неорганического, также приводит к понижению уровня – SH-групп и повышения – SS-групп в крови и печени всех опытных групп, и как следствие – снижение тиолдисульфидного коэффициента.

Ключевые слова: крысы, метаболические показатели, интоксикация, медь, цинк, кадмий, свинец, тиолдисульфидное состояние.

Summary

Kalinin I.V., Danchenko N.N., Tsudzevich B.A. Indexes of metabolism of the rats, poisoned with heavy metals.

In the work are presented the indexes of experimental research of metabolic data of rats, poisoned with heavy metals (Cu, Zn, Cd, Pb).

It was revealed that the intoxication rats ions of copper, zinc, cadmium and lead affects the course of the citric acid cycle reactions, leads to activation a number of enzymes in the blood, increases the level of total and direct bilirubin, creatinine, urea, glucose, chloride, magnesium, calcium and potassium, reduces albumin, total protein, cholesterol, triglycerides, sodium and inorganic phosphorus, also leads to lower – SH-groups, and increases – SS-groups in the blood and liver of all experimental groups, and as a result – reduced thiol-disulfide coefficient.

Key words: rats, indexes of metabolism, intoxication, copper, zinc, cadmium, lead, thiol-disulfide state.

Рецензент: д.біол.н., проф. В.К. Рибальченко