

period. In relation to this, the advantage to take passive immune preventive measures against BLV is justified, the technique to make goat's hyperimmune serum (HIS) against cattle leucosis virus (BLV) is given. HIS targeted application is shown to prevent early postnatal calves in the infection-vulnerable herds from being attacked by this leucosis infection. HIS is applied once. HIS preventive efficiency was tested on 18 newborn lambs that were experimentally infected with BLV-containing material in the background of HIS single dose per os. The effect was 100% preventive. The infection level made up 50% in the control group of calves (no HIS applied)

УДК 619:615.916:636.028

ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕЧЕНОЧНОЙ ФЕРМЕНТЕМИИ В УСЛОВИЯХ КАДМИЕВОЙ ИНТОКСИКАЦИИ МЫШЕЙ

Е. А. Ткаченко, аспирант

М. А. Дерхо, доктор биологических наук, профессор

О. С. Романкевич, магистрант

Т. И. Середа, кандидат биологических наук, доцент

Л. Ф. Мальцева, кандидат ветеринарных наук, доцент

Уральская государственная академия

ветеринарной медицины

E-mail: tvj_t@mail.ru

Ключевые слова: кадмий, интоксикация, печень, супернатант, ферменты, мыши

Реферат. Изучено изменение активности ферментов (аспартатаминотрансферазы (АсАТ), аланинаминотрансферазы (АлАТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), гамма-глутамилтрансферазы (γ -ГТФ)) в супернатантах печени мышей на фоне кадмиевой интоксикации. Установлено, что на фоне ежедневного введения животным *per os* сульфата кадмия в дозе 40 мг на голову уменьшается масса печени (достоверно с третьих суток интоксикации), развивается ферментемия, максимальная выраженность которой определяется как временем экспозиции токсиканта в организме, так и ролью ферментативных реакций, катализируемых АлАТ, АсАТ, ЩФ, γ -ГТФ, в поддержании метаболических потоков в клетках печени и организма в целом. Так, активность аминотрансфераз в супернатанте печени максимально увеличивается через сутки от начала интоксикации, отражая уровень катаболических процессов; щелочной фосфатазы – на третьи, характеризуя степень энергодифицита; γ -ГТФ – на восьмые, определяя степень заимствования аминокислот в тканях организма. Ферментемия является показателем компенсаторных возможностей печени и динамики развития патологических изменений.

Соли тяжелых металлов, в частности соли кадмия, попадая из окружающей среды в организм животных, вызывают загрязнение эндоэкологического пространства и нарушают тканевый и клеточный гомеостаз. Токсическое действие кадмия обусловлено преимущественно взаимодействием с белками организма, поэтому его часто называют белковым ядом [1].

Центральным метаболическим органом, ответственным за снабжение организма аминокислотами и белками, является печень. В органе синтезируются все альбумины, 90% α_1 -глобулинов, 75% α_2 -макроглобулинов и 50% β -глобулинов, а кроме того, печень участвует в поддержании постоянного аминокислотного состава крови за счёт протекающих в её клетках реакций переаминиро-

вания и дезаминирования с участием соответствующих ферментов. Кроме этого, печень обеспечивает связывание и обезвреживание токсических веществ экзогенного происхождения [2, 3], в том числе и кадмия [4, 5].

В настоящее время многие авторы приходят к заключению, что в основе приспособления организма к действию экзотоксикантов лежит пластичность и динамичность белков [3, 4]. При этом количественные и качественные перестройки макромолекул обязательно сопровождаются реорганизацией ферментных систем клеток органов и тканей [6–8]. Однако экспериментальных работ, посвященных изучению влияния токсикантов на клеточный и субклеточный уровень организма животных, с участием белковых систем, повреж-

даемых либо принимающих участие в промежуточном метаболизме чужеродных химических соединений, недостаточно.

В связи с этим целью наших исследований явилось изучение количественных изменений ферментов в супернатанте печени организма мышей на фоне кадмиевой интоксикации.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Экспериментальные исследования выполнены в 2013 г. на базе вивария и кафедры органической, биологической и физколлоидной химии ФГБОУ ВПО «Уральская государственная академия ветеринарной медицины». Объектом исследования служили половозрелые самцы белых лабораторных мышей средней массой 25–30 г ($n=60$). Все животные находились на стандартном пищевом рационе, имели свободный доступ к воде и пище в течение суток. Кадмиевую интоксикацию вызывали путем ежедневного введения сульфата кадмия per os в дозе 40 мг на голову (в пересчете на Cd^{2+} 21,5 мг).

Материал для исследований (печень) получали после декапитации мышей, которую проводили под наркозом эфира с хлороформом с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации, и в соответствии с требованиями правил проведения работ с использованием экспериментальных животных, до интоксикации, через сутки, на 3, 8 и 15-й день интоксикации. После декапитации мышей печень перфузировали охлажденным физраствором, гомогенизировали в среде выделения, содержащей 0,005 н. Tris, 0,1 н. KCl в соотношении 1:100. Полученный гомогенат центрифугировали. В супернатанте определяли активность аспаратаминотрансферазы (АсАТ), аланинаминотрансферазы (АлАТ), гамма-глутамилтрансферазы (γ -ГТФ), щелочной фосфатазы (ЩФ) при помощи стандартных наборов реактивов «Клини-тест». Активность ферментов рассчитывали на 1 г ткани.

Статистическую обработку данных проводили методом вариационной статистики на ПК с помощью табличного процессора «Microsoft Excel – 2003» и пакета прикладных программ «Биометрия». Достоверность различий между группами оценивали с учетом непараметрического критерия Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Экспериментальная кадмиевая интоксикация путем ежедневного введения сульфата кадмия per os в дозе 40 мг/на голову (21,5 мг Cd^{2+}) сопровождалась гибелью 1 особи на 7-е сутки эксперимента, 6 – на 9-е сутки и 3 – на 11-е сутки. При этом в опытной группе были отмечены случаи каннибализма.

Одним из органов-мишеней при кадмиевой интоксикации является печень, её функциональное состояние определяет картину метаболизма в организме мышей. Токсическое действие тяжелого металла связано, в первую очередь, с тем, что его ионы при поступлении в организм животных взаимодействуют с сульфгидрильными группами белков, в частности ферментов, образуя устойчивые соединения – меркаптиты [4] и влияя, таким образом, на их каталитическую активность.

Так, через сутки после начала введения сульфата кадмия в супернатанте печени наблюдалось увеличение активности трансфераз (АсАТ, АлАТ, γ -ГТФ) и ЩФ (таблица) соответственно в 2,67; 3,23; 2,56 и 2,49 раза, хотя масса органа практически не изменялась по сравнению с фоновыми величинами. При этом среди аминотрансфераз в начале интоксикации незначительно превалировало повышение анаболической АлАТ над катаболической АсАТ, что отражало:

- обеспеченность печени и организма мышей в целом белковыми субстратами за счёт их транспорта в гепатоциты с помощью γ -ГТФ;
- энергией, высвобождаемой при участии ЩФ;
- попытку организма мышей стимулировать биосинтетические процессы в условиях связывания некоторой части каталитических белков кадмием.

Следовательно, токсическое воздействие кадмия в клетках печени компенсаторно активировало синтез ферментов, что позволяло органу поддерживать состояние белкового метаболизма в организме мышей в рамках «фоновой» гомеостаза. Об этом свидетельствует недостоверное изменение соотношения между трансферазами в виде коэффициента де Ритиса (АсАТ/АлАТ) и $\frac{\text{АсАТ} + \text{АлАТ}}{\gamma - \text{ГТФ}}$.

Наиболее ярко токсическое действие кадмия на клетки печени и, соответственно, организм мышей начинало проявляться с 3-х суток интоксикации. Это сопровождалось уменьшением массы органа более чем в 1,5 раза ($P < 0,05$), что, вероятно

Активность ферментов в супернатанте печени ($\bar{x} \pm S\bar{x}$)

Показатель	До интоксикации (фон) (n = 10)	Время воздействия, сут			
		1 (n = 10)	3 (n = 10)	8 (n = 10)	15 (n = 10)
Масса печени, г	1,76±0,06	1,60±0,15	1,16±0,03*	1,20±0,06*	1,04±0,06*
АсАТ, мкмоль/ч · мл	547,84±8,67	1461,14±91,71*	253,77±26,01*	440,31±51,18	403,57±13,32*
АлАТ, мкмоль/ч · мл	508,52±56,06	1652,06±69,98*	199,38±24,61*	345,18±17,05*	291,23±14,75*
Коэффициент де Ритиса, у.е.	1,08±0,10	0,88±0,06	1,27±0,14	1,28±0,17	1,41±0,09*
γ-ГТФ, Е/л	1033,26±39,02	2649,66±119,87*	15917,10±636,98*	42632,00±831,65*	9736,25±365,39*
$\frac{\text{АсАТ} + \text{АлАТ}}{\gamma - \text{ГТФ}}$, усл. ед.	1,02±0,06	1,17±0,08	0,028±0,002*	0,018±0,001*	0,072±0,003*
ЩФ, Е/л	1909,80±36,44	4773,54±397,77*	30450,90±1275,81*	23438,00±1887,58*	20805,00±1589,65*

* P<0,05 по сравнению с величинами до интоксикации.

являлось, во-первых, следствием снижения обеспеченности гепатоцитов кислородом, ведущего к их последующему некрозу и коллапсу стромы; во-вторых, токсическим действием как самого кадмия, так и метаболитов, образующихся в ходе его биотрансформации, что инициировало еще большее повреждение гепатоцитов. В совокупности данные причины обуславливали изменение функционального состояния клеток печени, что проявлялось в виде:

– снижения каталитической активности аминотрансфераз (см. таблицу), являющегося следствием апоптоза гепатоцитов, угнетения биосинтеза ферментов и взаимодействия кадмия с меркаптогруппами энзимов с образованием неактивных металлотионинов. Хотелось бы обратить внимание на то, что в данных условиях активность АсАТ превалирует над АлАТ, повышая значение коэффициента де Ритиса до 1,27±0,14–1,41±0,09 у.е. Следовательно, на фоне прогрессирующего апоптоза гепатоцитов компенсаторно усиливается функциональная активность митохондрий, позволяя органу частично покрывать свои энергозатраты и поддерживать функциональную активность клеток;

– формирования «катаболического» профиля белкового обмена в органе и организме в целом. В условиях нарастающей кадмиевой интоксикации прогрессирует распад тканевых белков. Поэтому резко увеличивается каталитическая активность γ-ГТФ (в 15–41 раз по сравнению с фоном), отражая, с одной стороны, меру заимствования аминокислот из тканей организма мышей и развития в них дистрофических изменений, с другой – активацию анаболического глюконео-

генеза, способствующего частичной компенсации энергодефицита. Поэтому значения коэффициента $\frac{\text{АсАТ} + \text{АлАТ}}{\gamma - \text{ГТФ}}$ уменьшались более чем в 36 раз

по сравнению с фоновыми величинами. Однако тканевые резервы белков в организме мышей постепенно исчерпываются. Поэтому к 15-м суткам эксперимента наблюдалось снижение активности γ-ГТФ до 9736,25±365,39 Е/л на 1 г ткани, что отражало как уменьшение скорости транспорта аминокислот через клеточные мембраны, так и снижение заимствования аминокислот из любых клеток организма;

– усиления регуляции биоэнергетики за счёт активности щелочной фосфатазы. Максимально активность фермента повышалась на 3-и сутки кадмиевой интоксикации, что отражало попытку организма мышей предельно использовать макроэргические соединения для покрытия энергозатрат организма в условиях прогрессирующей дистрофии и апоптоза клеток. В дальнейшем активность ЩФ постепенно снижается, хотя и к 15-м суткам эксперимента превышает фоновые значения в 10,9 раза.

В целом характер изменения каталитической активности ЩФ в супернатанте печени в ходе кадмиевой интоксикации свидетельствовал о наличии дефицита макроэргов в клетках органа и организма мышей, что способствовало формированию и сохранению «катаболического» профиля в белковом метаболизме.

ВЫВОДЫ

1. Кадмиевая интоксикация, вызванная путём ежедневного введения сульфата кадмия per os

в дозе 40 мг на голову (в пересчете на Cd^{2+} 21,5 мг), характеризовалась уменьшением массы печени и развитием ферментемии.

2. Активность аминотрансфераз (АлАТ, АсАТ) в супернатанте печени максимально увеличилась через сутки от начала интоксикации,

ЩФ – на 3-и, а γ -ГТФ – на 8-е, определяя характер изменчивости метаболических потоков в органе и организме животных в целом.

3. Ферментемия является маркером компенсаторных возможностей печени и динамики развития патологических сдвигов в её клетках.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Воробьева Р.С., Бубнова Н.И. Действие на организм элементарного и теллуристого кадмия // Гигиена труда и профессиональные заболевания. – 1981. – № 2. – С. 42–43.
2. Стежка В.А., Дмитруха Н.Н., Диденко М.Н. Сравнительное исследование токсических эффектов свинца и кадмия на селезенку и спленоциты крыс. – Киев: Ин-т медицины труда АМН Украины, 2004. – С. 2–9.
3. Третьяков А.М., Скридоненко А.Д. Свободнорадикальные процессы в реализации токсического действия тяжелых металлов. – М.: Наука, 2001. – С. 35.
4. Иванова В.П. К вопросу о механизме токсического действия кадмия на живые организмы // Материалы II Междунар. науч. конф. – Саранск: Мордовия-ЭКСПО, 2009. – С. 58–61.
5. Калиман П.А., Охрименко С.М. Цикл глюкоза – жирные кислоты при оксидативном стрессе у крыс, вызванном хлоридом кобальта // Укр. биохим. журн. – 2005. – Т. 77, № 2. – С. 154–158.
6. Киреев Р.А. Влияние ионов кадмия на свободнорадикальные процессы и активность Na^+ , K^+ -АТФазы в тканях крыс // Токсикологический вестник. – 2005. – № 4. – С. 12–15.
7. Лазарева Л.В. Активность аминотрансфераз в различных тканях свиней // Фундаментальные исследования. – 2007. – № 9. – С. 72–74.
8. Стежка В.А., Лампека Е.Г., Дмитруха Н.Н. К механизму материальной кумуляции тяжелых металлов в организме белых крыс // Гигиена труда. – 2001. – Вып. 32. – С. 219–230.

CHARACTERISTIC OF LIVER FERMENTEMIA UNDER THE CONDITIONS OF MICE CADMIUM INTOXICATION

Е.А. Tkachenko, М.А. Derkho, О.С. Romankevich, Т.І. Sereda, L. F. Maltseva

Key words: cadmium, intoxication, liver, supernatant, enzyme, mice

Abstract. *The paper studies changes in the activity of enzymes (aspartate aminotransferase, AsAT), alanine aminotransferase, AlAT), alkaline phosphatase, AP), gamma-glutamate transferase, γ -GTF) in mice's liver supernatant in the background of cadmium intoxication. It was identified that in the background of daily receiving cadmium sulfate per os at the dose of 40 mg/animal, liver weight goes down (significantly from the 3rd day of the intoxication), fermentemia progresses with its maximal expression determined both by the time of exposition to the toxicant in the body and the role of fermentative reactions catalyzed by AsAT, AlAT, AP and γ -GTF to maintain metabolic flows in the cells of the liver and body on the whole. Thus, the activity of aminotransferases in the liver supernatant maximally increases the day after the intoxication start reflecting the level of catabolic processes; that of alkaline phosphatase – on the third day characterizing the level of power deficit; γ -GTF – on the eighth day determining the degree of amino acids borrowed from the body tissues. Fermentemia is the index of liver compensatory possibilities and dynamics of pathological changes.*