

ХАРАКТЕРИСТИКА БІЛКОВОГО СКЛАДУ КРОВІ ЩУРІВ, ОТРУЄНИХ СВИНЦЕМ

І. А. Лазаренко, Н. М. Мельникова

Національний університет біоресурсів і природокористування України

Наведено дані експериментальних досліджень щодо білкового складу крові щурів отруєних макродисперсною та наноформою свинцю. Досліджено рівень маркера токсичного ураження організму — цинкпротопорфірину в крові; за результатами досліджень встановлено підвищення його вмісту на 7-та 14-й день експерименту. Виявлено зниження рівня загального білка в крові щурів отруєних макродисперсною та наноформою свинцю. Установлені різноспрямовані зміни вмісту окремих фракцій білків сироватки крові щурів отруєних свинцем в різних дисперсних формах, а саме зменшення кількості альбумінів, α_1 - та α_2 -глобулінів та підвищення рівня β - і γ -глобулінів.

Ключові слова: ЩУРИ, ОТРУЄННЯ, МАКРОДИСПЕРСНА ФОРМА СВИНЦЮ, НАНОФОРМА СВИНЦЮ, ЦИНКПРОТОПОРФІРИН, АЛЬБУМІНИ, α_1 -, α_2 -, β -, γ -ГЛОБУЛІНИ

Нині народне господарство України перебуває в умовах постійного зростання техногенного навантаження. Антропогенна діяльність супроводжується розсіюванням значної кількості хімічних елементів, залучених до міграційного процесу [1]. Важкі метали є пріоритетними забруднювачами повітря, водоймищ і ґрунтів у глобальних і регіональних масштабах. Реальна загроза забруднення біосфери свинцем обумовлена, насамперед, його стійкістю, розчинністю в атмосферних опадах, здатністю до сорбції ґрунтом, рослинами, донними відкладеннями, що у сукупності призводить до поступового накопичення цього елемента в середовищі існування людини і створює загрозу для її здоров'я [2, 3].

Свинець є одним з головних та небезпечних забруднювачів навколишнього середовища. Він порушує екологічну рівновагу, через токсичний стрес спричиняє різноманітні пошкодження функціонального стану організму тварин і людей [4]. Свинець, потрапляючи в організм у порівняно невеликих дозах, але впродовж тривалого часу, здатний накопичуватись у різних органах і тканинах та викликати токсичні ефекти, які проявляються порушенням природного перебігу біохімічних процесів, структури і функції клітин, зокрема проникності останніх для хімічних компонентів внутрішнього середовища [2, 4]. Особливістю біотичної дії свинцю є здатність до канцерогенного, тератогенного, гонадотоксичного, ембріотоксичного та мутагенного впливу на організм [3].

Особливу увагу науковців привертають наночастинки важких металів, зокрема свинцю, оскільки швидкий розвиток нанотехнологій призводить до підвищення рівня їх взаємодії з біооб'єктами, при цьому інформації щодо потенційної небезпеки для здоров'я нині недостатньо [5, 6].

Наночастинки цікаві своїми надмалими розмірами, що призводить до змін їх фізико-хімічних властивостей (каталітичних, біологічних і ін.). Особливості поверхні і розміри наночастинок дозволяють їм вступати в прямий контакт на молекулярному рівні з біологічними тканинами та системами, а також різними хімічними сполуками і окремими структурами клітин (білками, нуклеїновими кислотами та ін.) [6–8].

Незалежно від шляху потрапляння, у крові свинець циркулює в комплексі з амінокислотами, утворюючи з білками крові міцний зв'язок, тому впродовж певного часу ксенобіотик розподіляється й депонується в усіх органах організму. Особливо у великих кількостях свинець накопичується в печінці, оскільки в ній підвищена кількість білків металотіонеїнів [9].

Білковий обмін у тварин є чи не найбільш інформативним показником при техногенному забрудненні середовища, оскільки дає можливість охарактеризувати обмінні процеси в

організмі, а токсичну дію свинцю напряду пов'язують із впливом на білоксинтетичні процеси в організмі тварин. За різних фізіологічних станів та при токсичних ураженнях організму співвідношення між фракціями білків сироватки крові змінюється: кількість окремих білкових фракцій знижується, а інших — підвищується. Тому для характеристики стану білкового обміну і виявлення його порушень необхідно досліджувати білкові фракції сироватки крові [10, 11].

Враховуючи вищесказане, метою роботи було дослідити фракційний склад білків крові щурів при отруєнні свинцем в макродисперсній та наноформі.

Матеріали і методи

Дослідження з вивчення білкового складу крові щурів проводили на базі наукової лабораторії кафедри біохімії тварин, якості і безпеки сільськогосподарської продукції ім. акад. М. Ф. Гулого НУБіП України та віварію факультету ветеринарної медицини. В експериментах використовували статевозрілих самців білих лабораторних щурів масою тіла 200–220 г, які утримувались у групових клітках на стандартному раціоні. Отруєння щурів проводили впродовж 14 діб шляхом перорального введення 1 % розчину свинцю ацетату в дозі 7 мг/100 г маси тіла тварини, що становить 1/110 ЛД₅₀ та аналогічної дози наночастинок свинцю, отриманих ерозійно-вибуховим методом. Інтактним тваринам перорально вводили відповідну кількість фізіологічного розчину. Дослід проводили за такою схемою: 1 група — інтактні щури; 2 група — щури отруєні ацетатом свинцю (макродисперсна форма); 3 група — щури, отруєні наночастинками свинцю (наноформа). У кожній групі було по 10 тварин. Загальний білок визначали біуретовим методом. Білки сироватки крові фракціонували методом висолювання фосфатним буфером. Вимірювання загального білка та його фракцій проводили на біохімічному аналізаторі «MicroLab–200» (Нідерланди) з використанням стандартних наборів реагентів фірми Human (Німеччина).

Для контролю за відтворенням свинцевої інтоксикації в крові щурів вимірювали цинкпротопорфірін за допомогою приладу Гемофлюориметр 206 Д [12].

Експерименти проводили відповідно до конвенції Ради Європи щодо захисту хребетних тварин, яких використовують у наукових цілях.

Результати досліджень оброблено загальноприйнятими методами варіаційної статистики за допомогою комп'ютерної програми MS Excel з використанням t-критерію Стьюдента.

Результати й обговорення

Біологічне моделювання свинцевого отруєння у піддослідних тварин констатували за підвищенням в крові одного з маркерів інтоксикації — цинкпротопорфірину. Під час експерименту рівень цинкпротопорфірину збільшувався після 7-разового перорального введення шурам макродисперсної та наноформи свинцю до $75,6 \pm 5,9$ та $83,7 \pm 6,8$, відповідно, проти $61,2 \pm 4,9$ (мкМ/Мгема) у контролі, а після 14 введень, відповідно, до $120,8 \pm 8,2$ та $141,4 \pm 9,5$ проти $72,3 \pm 13,2$ (мкМ/Мгема). Підвищення вмісту цинкпротопорфірину в крові щурів, які отримували різні форми свинцю, є підтвердженням негативного впливу ксенобіотика на процес синтезу гему. Свинець блокує ферохелатазу — фермент, який бере участь у включенні заліза в молекулу протопорфірину, внаслідок чого, замість гему утворюється Zn-протопорфірін і вільний пул Fe²⁺. Порушення синтезу гему, котрий входить не тільки в склад гемоглобіну, але й інших металопротейнів (NO-синтази, каталази, мієлопероксидази та ін.), накопичення високореакційного вільного пулу Fe²⁺ вносять значний вклад в зміни системи NO, розвиток оксидантного і нітрозильного стресу [2, 13].

Однією з основних метаболічних систем, що визначає фізіолого-біохімічний гомеостаз організму, є білковий обмін [14]. Разом з тим, білки є досить лабільною системою, що відображає стан організму, а також ті зміни, які в ньому відбуваються під впливом внутрішніх

та зовнішніх чинників. Зміна хімічного складу зовнішнього середовища спричиняє зміну білкового складу крові тварин.

Найбільш часто хімічній агресії підлягає печінка, оскільки саме їй належить головна детоксикуюча роль, яка полягає в затримці, нейтралізації і видаленні з організму токсичних речовин, які екскретуються разом із жовчю. Морфологічні дослідження підтверджують високу чутливість печінки до дії різних екзогенних чинників [3].

Враховуючи той факт, що печінка є основним органом синтезу багатьох сироваткових білків, то при токсичному ураженні її функціональна активність знижується, що і підтверджується результатами наших досліджень.

Так рівень загального білка в крові (таблиця) знижується на 28,2 та 24,7 %, у щурів, отруєних макродисперсною та наноформою свинцю, відповідно, порівняно з інтактними тваринами. Таким чином, гіпопротеїнемія, яка виникає внаслідок отруєння свинцем, може свідчити про порушення білоксинтезувальної функції печінки.

Відомо, що інтенсивність і характер метаболізму білків в організмі тварин характеризується концентрацією їх складових. Співвідношення між фракціями білків крові за різних фізіологічних умов змінюється [3, 4].

Як видно з таблиці, вміст альбумінів достовірно знижується відповідно на 6,9 та 9,1 % у тварин, отруєних макродисперсною та наноформою свинцю, порівняно з контролем.

Таблиця

Білковий склад сироватки крові щурів, отруєних макродисперсною та наноформою свинцю ($M \pm m$, $n=10$)

Показники	Інтактні тварини	Щури, отруєні ацетатом свинцю	Щури, отруєні наночастинками свинцю
Загальний білок, г/л	68,2±5,5	53,2±4,3*	54,7±4,2*
Альбуміни, %	51,2±4,1	44,3±3,1*	42,1±3,8*
α_1 -глобуліни, %	6,8±0,6	5,3±0,4*	4,8±0,4*
α_2 -глобуліни, %	9,5±0,7	5,7±0,4*	6,2±0,5*
β -глобуліни, %	13,7±1,1	18,2±1,5*	18,5±1,7*
γ -глобуліни, %	18,8±1,8	26,5±2,2*	28,4±2,4*

Примітка: * — $p < 0,05$, дані вірогідні порівняно з інтактними щурами

Зниження вмісту альбумінів, можливо, є наслідком підвищення проникності судинної стінки і трансудації їх з кров'яного руслу, а також може свідчити про порушення функціонального стану печінки, оскільки саме вона є основним місцем синтезу альбумінів [15]. Встановлено зниження α_1 -глобулінів, відповідно, на 1,5 та 2 % та α_2 -глобулінів — на 3,8 і 3,3% у тварин, отруєних макродисперсною та наноформою свинцю. Враховуючи той факт, що близько 90 % α_1 - та α_2 -глобулінів синтезуються печінкою, отримані порушення, можливо, свідчать про дистрофічні зміни в гепатоцитах, що приводять до порушення біосинтезу білків цих фракцій [1, 3, 15]. Вміст β -глобулінів достовірно підвищувався відповідно на 4,5 і 4,8 % у тварин, отруєних макродисперсною та наноформою свинцю порівняно з контролем. На нашу думку, отримані зміни можна пояснити як результат загальної реакції ретикуло-ендотеліальної системи на дію екзогенних факторів.

Виявлене підвищення γ -глобулінів на 7,7 % у щурів, отруєних макродисперсною та 9,6 % наноформою свинцю, може свідчити про стимулювання системи фагоцитуючих мононуклеарів та посилення вироблення імуноглобулінів.

Висновки

Отруєння щурів свинцем як у макродисперсній, так і наноформі, призводить до порушень білкового складу їх крові та підвищення вмісту цинкпротопорфірину, що може викликати метаболічні зміни в організмі тварин.

Перспективи подальших досліджень. У зв'язку зі встановленими змінами білкового складу крові щурів за отруєння макродисперсною та наноформою свинцю, необхідно продовжувати дослідження впливу різних форм свинцю на обмінні процеси в організмі.

A. Lazarenko, N. M. Melnikova

CHARACTERISTICS OF THE BLOOD PROTEIN COMPOSITION OF RATS POISONED WITH LEAD

S u m m a r y

The data of experimental studies on the protein composition of blood of rats poisoned macrodispersed and nanoform lead. The level of a marker of toxic damage of the body - zincprotoporphyrin in the blood, the results of studies found an increase of its content on the 7th and 14th day of the experiment. A decrease in total protein in the blood of rats poisoned macrodispersed and nanoform lead. The multi directional changes in the content of individual fractions of blood serum proteins of rats poisoned with lead in different forms of dispersed, namely, reduction of albumin, α 1- and α 2-globulin and increased levels of β - and γ -globulins were established.

И. А. Лазаренко, Н. М. Мельникова

ХАРАКТЕРИСТИКА БЕЛКОВОГО СОСТАВА КРОВИ КРЫС, ОТРАВЛЕННЫХ СВИНЦОМ

А н н о т а ц и я

Приведены данные экспериментальных исследований белкового состава крови крыс отравленных макродисперсной и наноформой свинца. Исследован уровень маркера токсического поражения организма — цинкпротопорфирина в крови; по результатам исследований установлено повышение его содержания на 7 и 14-й день эксперимента. Установлено снижение уровня общего белка в крови крыс отравленных макродисперсной и наноформой свинца. Установлены разнонаправленные изменения содержания отдельных фракций белков сыворотки крови крыс отравленных свинцом в разных дисперсных формах, а именно уменьшение количества альбуминов, α 1- и α 2-глобулинов и повышение уровня β - и γ -глобулинов.

1. *Кравців Р. Й.* Токсичний ефект комбінованої дії солей важких металів на організм щурів / Р. Й. Кравців, Г. А. Буцяк, В. І. Буцяк // Вісник аграрної науки. — 2007. — № 1. — С. 33–36.

2. *Дмитруха Н. М.* До проблеми імунотоксичності свинцю і кадмію / Н. М. Дмитруха // Современные проблемы токсикологии. — 2009. — № 1. — С. 4–8.

3. *Кравців Р. Й.* Сумісний вплив важких металів на організм тварин / Р. Й. Кравців, Г. А. Буцяк // Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С. З. Гжицького. — 2008. — Т. 10. — № 2(37). — С. 3–8.

4. *Мельникова Н. М.* Характеристика вмісту окремих мікроелементів у печінці, нирках, селезінці вагітних щурів за отруєння плумбумом / Н. М. Мельникова, Т. А. Ткаченко, І. А. Лазаренко // Біологія тварин. — 2010. — Т. 12, № 1. — С. 159–163.

5. *Kagan V. E.* Nanomedicine and nanotoxicology: two sides of the same coin / V.E. Kagan, H. Bayir, A. A. Shvedova // Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine. — 2005. — 1. — P. 313–316.

6. *Gatti A. M.* Detection of micro and nanosized biocompatible particles in blood / A. M. Gatti, M. Montana // J. of Mat. Sci. Mat in Med. — 2004. — 15 (4). — P. 469–472.

7. *Gras S. L.* Functionalized amyloid fibrils for bionanotechnology : Australian Research Council Nanotechnology Network International Conference on Nanoscience and Nanotechnology; 2006 Jul 3–7; Brisbane, Australia / S. L. Gras, A. M. Squires, C. M. Dobson.

8. *Dutta D.* Adsorbed proteins influence biological activity and molecular targeting of nanomaterials / D. Dutta, S. K. Sundaram, J. G. Teeguarden, B. J. Riley // *Toxicol Sci.* — 2007. — 100 (1). — P. 303–315.

9. *Авакьянц Б. М.* Отравление животных солями тяжелых металлов и мышьяка / Б. М. Авакьянц, Л. А. Попова, Т. И. Коток [и др.] // *Ветеринарный консультант.* — 2006. — № 15. — С. 12–16.

10. *Забелина М. В.* Действие тяжелых металлов на биохимические показатели крови овец / М. В. Забелина // *Ветеринария.* — 2005. — С. 67–72.

11. *Влізло В. В.* Окисний метаболізм у довгастому мозку великої рогатої худоби в зв'язку з віком / В. В. Влізло, Д. Д. Остапів, А. З. Пилипець та ін. // *Біологія тварин.* — 2006. — Т. 8, № 1–2. — С. 139–143.

12. Instruction manual of ZP HEMATOFLUOROMETER Models 206 and 206 D, 1996.

13. *Трахтенберг И. М.* Роль свинца и железа, как техногенных химических загрязнителей, в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний / И. М. Трахтенберг, И. П. Лубянова, Е. Л. Апыхтина // *Медицина профилактическая.* — 2010. — № 7–8 (49). — С. 36–39.

14. *Hochachka P. W.* Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution / P. W. Hochachka, G. N. Somero. — New York–London : Oxford University Press US. — 2002. — 466 p.

15. *Камышников В. С.* Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике : 3-е изд. / В. С. Камышников. — М. : МЕДпресс-информ, 2009. — 896 с.

Рецензент: докторант, кандидат сільськогосподарських наук, с. н. с. Гавриляк В. В.