

УДК 613.6.01:613.6.02:613.6.06

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ И ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БЕЛЫХ БЕСПОРОДНЫХ КРЫС ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ХЛОРИДА КАДМИЯ *PER OS*

Смолянкин Д.А., Тимашева Г.В., Хуснутдинова Н.Ю., Байгильдин С.С., Каримов Д.О.,
Репина Э.Ф.

ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», г. Уфа, Россия

*Одним из основных механизмов токсического действия солей тяжелых металлов является угнетение ими ряда энзимов. Цель работы – оценить изменения уровня активности щелочной фосфатазы (ЩФ) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в сыворотке крови экспериментальных животных при хронической интоксикации хлоридом кадмия (CdCl₂). Трём группам белых беспородных крыс вводили водный раствор хлорида кадмия *per os* в различных дозах. Выявлено устойчивое снижение активности ЩФ у опытных животных в зависимости от увеличения дозы поллютанта. Установлено увеличение активности ЛДГ в сыворотке крови крыс 1-й и 3-й групп. Полученные данные свидетельствуют о том, что при хронической интоксикации кадмием происходит сбой в регуляторной активности ряда индикаторных ферментов, характеризующийся нарушением проницаемости биологических мембран и, следовательно, изменением функционального состояния клеток печени.*

Ключевые слова: тяжелые металлы, хлорид кадмия, щелочная фосфатаза, лактатдегидрогеназа, экспериментальные животные.

Для цитирования: Смолянкин Д.А., Тимашева Г.В., Хуснутдинова Н.Ю., Байгильдин С.С., Каримов Д.О., Репина Э.Ф. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ И ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БЕЛЫХ БЕСПОРОДНЫХ КРЫС ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ХЛОРИДА КАДМИЯ *PER OS*. Медицина труда и экология человека. 2020; 3:101-107

Для корреспонденции: Смолянкин Денис Анатольевич, младший научный сотрудник отдела токсикологии и генетики с экспериментальной клиникой лабораторных животных ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», e-mail: smolyankin.denis@yandex.ru.

Финансирование: исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

DOI: <http://dx.doi.org/10.24411/2411-3794-2020-10313>

DETERMINATION OF ALKALINE PHOSPHATASE AND LACTATE DEHYDROGENASE ACTIVITY IN BLOOD SERUM OF WHITE RATS AFTER CADMIUM CHLORIDE *PER OS* ADMINISTRATION

Smolyankin D.A., Timasheva G.V., Khusnutdinova N.Yu., Baigildin S.S., Karimov D.O., Repina E.F.
FBUN "Ufa Research Institute of Occupational Medicine and Human Ecology", Ufa, Russia

One of the main mechanisms of the toxic action of heavy metal salts is their inhibition of a number of enzymes. Purpose of the work: to assess changes in the level of alkaline phosphatase

(ALP) and lactate dehydrogenase (LDH) activity in the blood serum of experimental animals with chronic intoxication with cadmium chloride (CdCl_2). 3 groups of white outbred rats were injected with an aqueous solution of cadmium chloride per os in various doses. A steady decrease in the alkaline phosphatase activity was revealed in experimental animals, depending on the increase in the pollutant dose. An increase in LDH activity in the blood serum of rats of groups 1 and 3 was found. The data obtained indicate that with chronic intoxication with cadmium, a failure occurs in the regulatory activity of a number of indicator enzymes, characterized by a violation of the permeability of biological membranes, and, consequently, by a change in the functional state of liver cells.

Key words: heavy metals, cadmium chloride, alkaline phosphatase, lactate dehydrogenase, experimental animals.

For citation: Smolyankin D.A., Timasheva G.V., Khusnutdinova N.Yu., Baygildin S.S., Karimov D.O., Repina E.F. DETERMINATION OF ALKALINE PHOSPHATASE AND LACTATE DEHYDROGENASE ACTIVITY IN BLOOD SERUM OF WHITE RATS AFTER CADMIUM CHLORIDE PEROS ADMINISTRATION. *Occupational health and human ecology*. 2020; 3:101-107

For correspondence: Denis A. Smolyankin, Junior Researcher at the Department of Toxicology and Genetics with the Experimental Clinic of Laboratory Animals, Ufa Research Institute of Occupational Health and Human Ecology, e-mail: smolyankin.denis@yandex.ru

Funding: The study was not financially supported.

Conflict of interest: The authors declare they have no conflict of interest.

DOI: <http://dx.doi.org/10.24411/2411-3794-2020-10313>

В ряду химических соединений, негативно влияющих на здоровье человека, соли тяжелых металлов (ТМ) занимают особое место, так как они не разлагаются, попадают в пищевые цепи и накапливаются в организме. Одним из распространенных загрязнителей воздуха, воды и почвы в крупных промышленных городах является токсичный микроэлемент кадмий (Cd). Он применяется в атомной энергетике, электронной и радиотехнической промышленности, при производстве аккумуляторов, различных сплавов и красок, как стабилизирующая добавка в процессе изготовления пластмассы. Этот тяжелый металл, характеризующийся высокой способностью к накоплению, обладает прямым повреждающим действием на организм человека и относится к 1-му классу токсичности. По современным оценкам его выведение происходит очень медленно, в течение 25–30 лет [1].

При продолжительном действии токсических агентов в концентрациях, не вызывающих внешне обнаруживаемого эффекта, могут проявляться скрытые изменения ряда биохимических показателей системы крови, которая является чувствительным индикатором, отражающим общее состояние организма [2].

Одним из ключевых механизмов токсического действия солей ТМ является их ингибирование ряда ферментов в результате блокирования сульфгидрильных (SH), иных функциональных групп в активных центрах и других биологически важных участках энзимов [3]. Кроме того, кадмий может изменять активность цинксодержащих ферментов [4], например щелочной фосфатазы (ЩФ) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ), замещая цинк.

Щелочная фосфатаза является индикаторным показателем холестаза, исследование активности ее необходимо для изучения метаболизма и функционального состояния печени.

Лактатдегидрогеназа как основной биохимический параметр углеводного обмена в клетке катализирует превращение пировиноградной кислоты (ПВК) в лактат. В результате повреждения целостности мембран происходит выброс данных ферментов в межклеточное пространство. Поэтому исследование вышеперечисленных энзимов позволяет на ранних стадиях выявить нарушения в работе органа [5]. Таким образом, наша основная **цель работы** заключалась в оценке изменений активности щелочной фосфатазы и лактатдегидрогеназы в сыворотке крови экспериментальных животных при хронической интоксикации хлоридом кадмия *per os*.

Материалы и методы

Исследование проведено на 40 белых беспородных лабораторных крысах массой тела 175-295 г, содержащихся в стандартных условиях вивария ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», характеризующихся постоянством комнатной температуры (20-25 °С), уровнем влажности (30-70%) и 12-часовым искусственным освещением (с 08:00 до 20:00 ч). В начале эксперимента животные были разделены на 4 группы по 10 особей (5 самцов и 5 самок) в каждой. В течение 3 мес. ежедневно подопытным крысам вводили водный раствор хлорида кадмия *per os*. Дозу вводимого токсиканта рассчитывали исходя из допустимого недельного потребления кадмия, определенного ВОЗ и комитетом экспертов по пищевым добавкам. 1-я группа животных получала водный раствор $CdCl_2$ в дозе 0,001 мг/кг; 2-я группа – в дозе 0,01 мг/кг; 3-й группе вводили поллютант в дозе 0,1 мг/кг. Контрольная группа интрагастрально получала эквивалентное количество дистиллированной воды. После 3 мес. затравки все животные проходили стадию восстановления продолжительностью 1 мес. Далее крысы выводились из эксперимента путем мгновенной декапитации. Следует отметить, что содержание и манипуляции над лабораторными животными проводились в соответствии с правилами, установленными «Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Strasbourg, 1986).

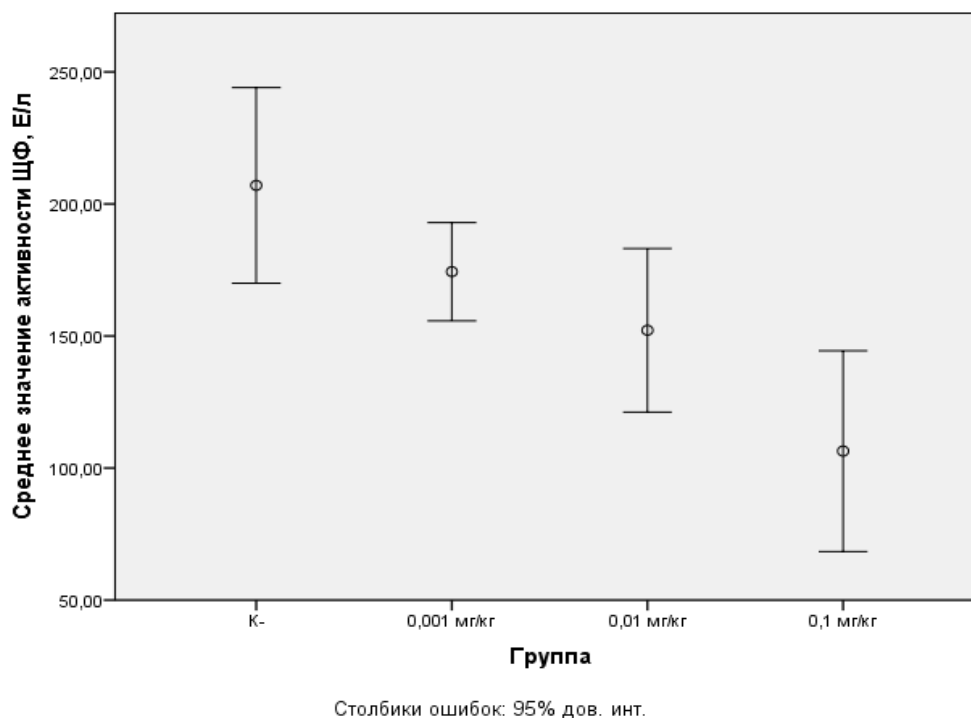
В сыворотке крови экспериментальных животных кинетическими методами были проанализированы уровни активности биохимических показателей с помощью наборов реагентов «Вектор - Бест» (г. Новосибирск, РФ) на лабораторном анализаторе «Stat Fax 3300» («Awareness Technology», USA) в соответствии с инструкциями производителя.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием пакетов анализа данных программы IBM SPSS Statistics 21 (IBM, USA), применяя однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Различия считали статистически значимыми при вероятности ошибки $p < 0,05$.

Результаты

Оценка результатов биохимических исследований после воздействия на организм водного раствора $CdCl_2$ выявила статистически значимые различия в средних показателях активности ЩФ в сыворотке крови экспериментальных животных ($F=8,9$; $p=0,001$). Показано статистически значимое понижение активности фермента во 2-й и 3-й опытных группах до $152,16 \pm 13,69$ Е/л и $106,42 \pm 16,81$ Е/л, т.е. на 26,5% ($p=0,046$) и 48,6% ($p=0,001$) соответственно, относительно контроля ($207,04 \pm 16,37$ Е/л) (рис. 1). Кроме того, определялось уменьшение активности ЩФ на 39,0% ($p=0,009$) в 3-й группе крыс относительно 1-й группы животных ($174,35 \pm 8,22$ Е/л).

Зависимость изменения активности ЩФ от дозы хлорида кадмия

Рис. 1. Зависимость изменения активности ЩФ от дозы $CdCl_2$

При исследовании активности ЛДГ получены следующие результаты. В 1-й группе животных регистрировали увеличение активности фермента до $1577,80 \pm 24,76$ Е/л (на 8,2%); в 3-й группе – до $1496,40 \pm 100,85$ Е/л относительно контроля ($1458,06 \pm 90,51$ Е/л). Во 2-й группе экспериментальных крыс наблюдалась снижение концентрации ЛДГ до $1421,90 \pm 58,86$ Е/л по сравнению с контролем (рис. 2), однако различия не достигали статистической значимости ($F=0,8$; $p=0,504$).

Обсуждение

Интоксикация экспериментальных животных хлоридом кадмия приводит к интенсивным изменениям функции печени, нарушая регуляторную функцию органа. В результате повреждения ионами кадмия из гепатоцитов высвобождаются индикаторные ферменты гепатоцеллюлярной травмы (ЛДГ), а также холестатических процессов (ЩФ), так как стаз или обратный поток желчи является токсичным для клеток печени.

Механизм ингибирующего действия хлорида кадмия на каталитическую активность щелочной фосфатазы неоднозначен. Данный процесс может быть связан с нарушением проницаемости плазматической мембраны в дополнение к изменениям баланса между синтезом и деградацией фермента. Кроме того, понижение ЩФ может быть обусловлено разрушением мембранной транспортной системы и ингибирующим эффектом на рост и пролиферацию клеток. В связи с этим отмеченное в нашем исследовании падение уровня активности ЩФ, которая участвует в транспорте фосфора через биомембраны и является показателем фосфорно-кальциевого обмена, при действии ТМ подтверждает угнетение выраженности фермента и согласуется с литературными данными [6].

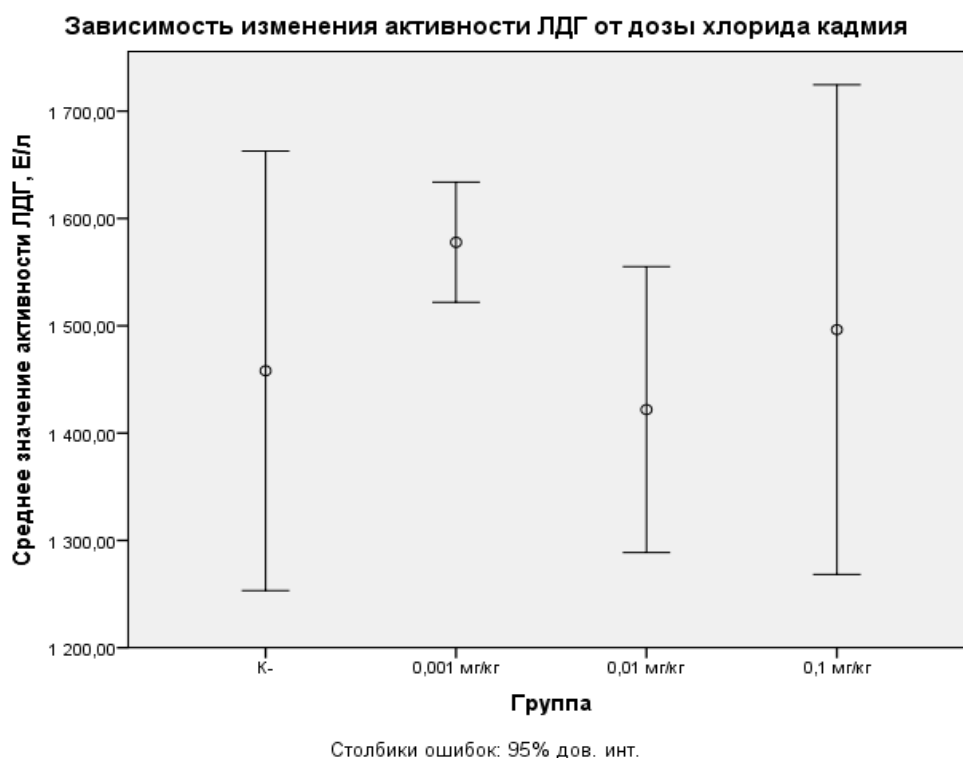


Рис. 2. Зависимость изменения активности ЛДГ от дозы CdCl_2

Для более полной оценки токсического воздействия хлорида кадмия в сыворотке крови крыс нами была исследована активность ключевого фермента углеводного обмена – ЛДГ. В литературе описано, что действие ТМ на организм приводит к развитию стресса, в клинических проявлениях которого, прежде всего, изменяется соотношение аэробных и анаэробных компонентов энергетического метаболизма [7]. Мы полагаем, что повышенное содержание фермента в сыворотке крови экспериментальных животных 1-й и 3-й группы обусловлено нарушением процесса превращения ПВК в лактат на фоне повреждающего действия ионов кадмия на клетки.

Заключение

В результате токсического влияния кадмия происходит трансформация пространственной конфигурации активного центра ферментов, что приводит к изменению уровня активности. В частности, у трех экспериментальных групп животных прослеживается устойчивая тенденция к статистически значимому снижению активности ЩФ по окончании исследования с увеличением дозы поллютанта. На наш взгляд, нарушение проницаемости клеточных мембран запускает процесс купирования биохимических процессов, который вызывает повреждение цитоскелета. Согласно Orororo et al. (2018) [8], ингибирование кадмием щелочной фосфатазы также может происходить за счет связывания тяжелого металла с группами SH, которые важны для активности фермента.

Одновременно было установлено увеличение активности лактатдегидрогеназы в сыворотке крови крыс 1-й и 3-й опытных групп, что может косвенно свидетельствовать о нарушении целостности мембран.

Таким образом, при хронической интоксикации кадмием у животных происходили нарушения активности ряда индикаторных ферментов, указывающие на изменения функционального состояния печени в зависимости от дозы токсиканта.

Список литературы:

1. Стосман К.И., Сивак К.В. Иммунологические нарушения у крыс при остром отравлении сульфатом кадмия. Биомед. журнал Medline.ru. 2020; 21 (Экспериментальная токсикология): 166-75.
2. Феклина М.С., Каменек Д.В., Юнусова Э.К., Каменек Л.К. Изменение активности лактатдегидрогеназы, аланинаминотрансферазы и аспаратаминотрансферазы сыворотки крови мышей под действием дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis*. Вестник новых медицинских технологий 2011; XVIII (3): 44-5.
3. Плетенева Т.В., Саломатин Е.М., Сыроешкин А.В., Бархударов Р.М. Токсикологическая химия. М.: ГЭОТАР – Медиа; 2005.
4. Заботкина Е.А., Лапирова Т.Б. Влияние кадмия на структурно-функциональное состояние иммунокомпетентных органов карпа. Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов. Материалы междунар. конфер.; 2004 6-9 сент.; Петрозаводск; 2004 с. 46-7.
5. Бочкарева А.В., Зимин Ю.В., Хомутов А.Е. Изменение активности лактатдегидрогеназы печени крыс при действии гепарина в условиях *in vitro*. Биология 2008; 5: 86-8.
6. Рабаданова А.И., Мурадова Г.Р., Чалаева С.А., Курбанова С.И., Абдуллаев В.Р. Динамика активности аминотрансфераз и щелочной фосфатазы в крови сеголеток воблы при хроническом воздействии ионов кадмия. Известия Самарского научного центра Российской академии наук 2016; 18 (2 Дополн 2): 613-5.
7. Шафран Л.М., Хомич Г.А., Третьякова Е.В., Самохина Н.А., Нехорошкова Ю.В., Третьяков А.М., и др. Экспериментальное изучение биопротекторных свойств пищевого концентрата полифенолов черники при экспозиции тяжелыми металлами. Медичні перспективи 2012; XVII (4): 98-104.
8. Orororo O.C., Asagba S.O., Oghri E., Egbune E.O. Effects of garden egg, carrot and oat-supplements on biochemical parameters in cadmium exposed rats. African Journal of Biochemistry Research 2018; 12 (3): 28-34.

References:

1. Stosman K.I., Sivak K.V. Immunological disorders in rats with acute poisoning with cadmium sulfate. Biomed. J Medline.ru. 2020; 21 (Experimental Toxicology): 166-75.
2. Feklina M.S., Kamenek D.V., Yunusova E.K., Kamenek L.K. Changes in the activity of lactate dehydrogenase, alanine amine transferase and aspartataminotransferase in mouse blood serum under the action of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. Bulletin of New Medical Technologies 2011; XVIII (3): 44-5.
3. Pleteneva T.V., Salomatin E.M., Syroeshkin A.V., Barkhudarov P.M. Toxicological chemistry. M.: GEOTAR - Media; 2005.

4. Zabotkina E.A., Lapirova T.B. Influence of cadmium on the structural and functional state of carp immunocompetent organs. Modern problems of physiology and biochemistry of aquatic organisms. Materials of the international. conf.; 2004 6-9 Sept; Petrozavodsk; 2004 p. 46-7.
5. Bochkareva A.V., Zimin Yu.V., Khomutov A.E. Changes in the activity of rat liver lactate dehydrogenase under the action of heparin in vitro. *Biology* 2008; 5: 86-8.
6. Rabadanova A.I., Muradova G.R., Chalaeva S.A., Kurbanova S.I., Abdullaev V.R. Dynamics of aminotransferase and alkaline phosphatase activity in the blood of roach underyearlings under chronic exposure to cadmium ions. *Bulletin of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences* 2016; 18 (2 Suppl 2): 613-5.
7. Shafran L.M., Khomich G.A., Tretyakova E.V., Samokhina N.A., Nekhoroshkova Yu.V., Tretyakov A.M., et al. Experimental study of bioprotective properties of food concentrate of blueberry polyphenols at exposure to heavy metals. *Medical Perspectives* 2012; XVII (4): 98-104.
8. Orororo O.C., Asagba S.O., Oghri E., Egbune E.O. Effects of garden egg, carrot and oat-supplements on biochemical parameters in cadmium exposed rats. *African Journal of Biochemistry Research* 2018; 12 (3): 28-34.

Поступила/Received: 1.09.2020

Принята в печать/Accepted: 3. 09.2020