

УДК: 615.916:577.121.9

Показники загального обміну і оксидативного стресу у щурів при тривалій дії малих концентрацій Cd²⁺**У Сі¹, Ю.Кот¹, К.Кот¹, Р.Морс², О.Доран², Хамдаллах Амжад¹, Є.Перський¹**¹Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна (Харків, Україна)²Університет Західної Англії (Бристоль, Велика Британія)

kot.juriy@gmail.com

У даній роботі було вивчено вплив тривалої дії доз кадмію в концентраціях, близьких до MRL (рівень мінімального ризику) на показники загального обміну і оксидативного стресу у лабораторних щурів. В сироватці крові визначали вміст загального білку, альбуміну, креатиніну, сечовини, холестерину, тригліцеридів, Ca²⁺, тиреотропного гормону та вільного тироксину, 8-ізопростану, карбонільованих білків, а також активності аланінамінотрансферази, аспартатамінотрансферази, лужної фосфатази, супероксиддисмутази і каталази. Введення 3-місячним щурам *per os* іонів кадмію в дозах 0,1 і 1 мг/кг маси протягом 36 діб призводить спочатку до зниження маси тіла, а після досягнення мінімуму – до його зростання. На 36 добу кінцева маса тіла піддослідних тварин нижча, ніж у контрольних. За дією обох доз Cd²⁺ у сироватці крові піддослідних тварин знижуються показники білкового та ліпідного обміну, підвищується вміст TSH, зменшується вміст вільного T₄ та індукується розвиток оксидативного стресу. Ступінь вираження цих ефектів вище при дії дози 1, ніж 0,1 мг/кг маси тіла тварин.

Ключові слова: кадмій, сироватка, білки, ліпіди, трансферази, лужна фосфатаза, Ca²⁺, TSH, T₄, оксидативний стрес.

Total metabolism and oxidative stress parameters in rats at long-term exposure to low concentrations of Cd²⁺**Wu Si, Yu.Kot, K.Kot, R.Morse, O.Doran, Hamdallah Amjad, E.Persky**

The effect of long-term action of cadmium doses in concentrations close to MRL (minimum risk level) on total metabolism and oxidative stress parameters in laboratory rats was studied. The content of total protein, albumin, creatinine, urea, cholesterol, triglycerides, Ca²⁺, thyrotropic hormone and free thyroxine, 8-isoprostane, carbonyl proteins, and the activity of alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase, superoxide dismutase and catalase were determined in the blood serum. The introduction of cadmium in doses of 0.1 and 1 µg/kg of weight to 3-month rats *per os* during 36 days leads initially to a decrease in body weight, and after reaching a minimum – to its growth. At the 36th day, the final body weight of experimental animals is lower than in the control animals. The blood serum analysis of experimental animals showed the decrease of protein and lipid metabolism parameters, increase of TSH level, decrease of free T₄ content and inducing of oxidative stress under the influence of both doses of Cd²⁺. The degree of these effects' expression is higher at a dose 1, than 0.1 µg/kg body weight of animals.

Key words: Cd²⁺, serum, proteins, lipids, transferases, alkaline phosphatase, Ca²⁺, TSH, T₄, oxidative stress.

Показатели общего обмена и оксидативного стресса у крыс при длительном воздействии малых концентраций Cd²⁺**У Си, Ю.Кот, Е.Кот, Р.Морс, О.Доран, Хамдаллах Амжад, Е.Перский**

В данной работе было изучено влияние длительного воздействия доз кадмия в концентрациях, близких к MRL (уровень минимального риска) на показатели общего обмена и оксидативного стресса у лабораторных крыс. В сыворотке крови определяли содержание общего белка, альбумина, креатинина, мочевины, холестерина, триглицеридов, Ca²⁺, тиреотропного гормона и свободного тироксина, 8-изопростана, карбонилированных белков, а также активности АлАТ, АсАТ, щелочной фосфатазы, супероксиддисмутази и каталазы. Введение 3-месячным крысам *per os* ионов кадмия в дозах 0,1 и 1 мг/кг в течение 36 суток приводит сначала к снижению массы тела, а после достижения минимума – к его росту. На 36 сутки конечная масса тела подопытных животных ниже, чем у контрольных. При действии обеих доз Cd²⁺ в сыворотке крови подопытных животных снижаются

показатели белкового и липидного обмена, повышается содержание TSH, уменьшается содержание свободного T₄ и индуцируется развитие оксидативного стресса. Степень выраженности этих эффектов выше при действии дозы кадмия в концентрации 1 мкг/кг массы тела животных.

Ключевые слова: кадмий, сыворотка, белки, липиды, трансферазы, щелочная фосфатаза, Ca²⁺, TSH, T₄, оксидативный стресс.

Вступ

Відомо, що надходження в організм людини та лабораторних тварин кадмію в концентраціях, що значно перевищують MRL – minimal risk level – рівень мінімального ризику – відсутності видимого негативного ефекту, і накопичення цього металу згодом викликають оксидативний стрес. Останній же є однією з важливих причин розвитку різноманітних патологій у всіх без винятку системах органів (Nair et al., 2013; Cuypers et al., 2010; Tribowo et al., 2014). У той же час практично немає досліджень хронічної дії кадмію в концентраціях, близьких до MRL – незначно більших або менших за нього, на процеси метаболізму, що відображають інтегральну картину патологічного стану. У даній роботі й було вивчено вплив тривалої дії таких доз кадмію на показники загального обміну і оксидативного стресу у лабораторних щурів.

Об'єкти і методи дослідження

Дослідження проведені на 3-місячних білих щурах-самцях породи Вістар, які утримувалися в стандартних умовах віварію Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. В експериментах дотримувалися рекомендацій проведення медико-біологічних досліджень відповідно до закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (Закон України №3447-IV, 2006) зі змінами, внесеними згідно із Законом №1759-VI (Зміни, внесені до Закону №3447-IV..., 2010).

Величина MRL кадмію для людини і лабораторних тварин при надходженні в організм протягом часу до року становить 0,5 мкг Cd/кг/добу (Toxicological profile for Cadmium, 2012). Тому в експериментах використовували 2 дози Cd²⁺ – 0,1 мкг/кг/добу (доза I) і 1,0 мкг/кг/добу (доза II), які вводили розчинами CdCl₂ з концентраціями 0,3025×10⁻⁶ М/л і 3,025×10⁻⁶ М/л відповідно. Тварини були поділені на 3 групи по 12 особин у кожній. У групі 1 – контрольній – вони отримували чисту воду; у групах 2 і 3 – розчини CdCl₂ в дозі I і II відповідно. В кожній групі 6 тварин отримували воду або розчини CdCl₂ протягом 15 діб, останні 6 – протягом 36 діб. Розчини хлориду кадмію і воду об'ємом 1 мл вводили через внутрішньошлунковий зонд щодня після зважування тварин в один і той же час.

Загальні показники обміну визначали в сироватці крові, яку отримували стандартним методом після декапітації тварин під тіопенталовим наркозом (Greene, 2002). Вміст загального білка, альбуміну, креатиніну, сечовини, холестерину, тригліцеридів, Ca²⁺, активності аланінамінотрансферази (ALT), аспартатамінотрансферази (AST) і лужної фосфатази (ALP) вимірювали на біохімічному аналізаторі STAT FAX 1904+ відповідними наборами реактивів фірми DAC-SpectroMed (Наборы производства ..., 2015). Вміст тиреотропного гормону (TSH) та вільного тироксину (T₄) – на імуоферментному аналізаторі STAT FAX 303+ наборами реактивів фірми Хема-Медика (Комплекты реагентов ..., 2015).

В сироватці крові визначали також показники оксидативного стресу. Вимірювали вміст 8-ізопростану (8 isoprostane ..., 2013), карбонільованих білків флуориметричним методом набором Protein Carbonyl Content (Protein Carbonyl Content Assay Kit, 2011), спектрофотометрично – активності супероксиддисмутази (SOD) набором (Superoxide Dismutase Assay Kit, 2016) і каталази (CAT) H₂O₂/оксидоредуктазним методом набором (Catalase Assay Kit, 2017) відповідно. Всі ці вимірювання проводили на мікропланшетному флуориметрі BioTek FL-600.

Статистичну обробку результатів вимірювань проводили за програмою Origin Pro 8. Перевірку нормальності - за Шапіро-Уїлкі. Використовували парний Т-тест (Glantz, 2007).

Результати

Відповідно до найбільш поширеної періодизації постнатального онтогенезу щурів лінії Вістар, у молодих 3-місячних тварин, що знаходяться в репродуктивному періоді, середній щоденний приріст маси тіла становить, в середньому, 0,15–1,5 % (Авдеева и др., 2013). Приріст маси

контрольних тварин протягом експерименту відбувався безперервно і за цей час склав до 36 діб 11%, що вкладається у ці межі (табл. 1).

Таблиця 1.

Вплив Cd^{2+} (мкг/кг маси) на масу тіла щурів (г) та її приріст (%)

Доба	Доза					
	0		0,1		1	
	Маса	Приріст маси між добами	Маса	Приріст маси між добами	Маса	Приріст маси між добами
1	197±3		220±7		207±2	
15	208±4*	15→1: +6	202±5*	15→1: - 8	200±3*	15→1: - 3
36	218±5*,**	36→1: +11	240±5*,**	36→1: +9	218±8*,**	36→1: +5

Примітка: * – зміни вірогідні ($p < 0,05$) у порівнянні з контролем;
** – зміни вірогідні ($p < 0,05$) у порівнянні з 15-ю добою.

Введення Cd^{2+} різко змінює динаміку маси тварин. Спочатку, при дії обох доз, їх маса не збільшується, а зменшується, і тільки після досягнення мінімуму починає підвищуватися. В обох випадках приріст маси до 36 доби експерименту у цих тварин нижче, ніж у контрольних. При цьому нижче і приріст маси у тварин, які отримували 1 мкг Cd^{2+} /кг маси, що вказує на виражену дозову залежність ступеня впливу на ріст тварин.

Оскільки виявлений ефект є інтегральним наслідком порушення метаболічних процесів в різних системах органів, особливості цих порушень були охарактеризовані за біохімічними показниками крові (табл. 2–5).

Таблиця 2.

Вплив Cd^{2+} (мкг/кг маси) на вміст загального білка (г/л), альбуміну (г/л), креатиніну (мМ/л) і сечовини (мМ/л) у сироватці крові щурів

Доба	Доза	Показники				
		Загальний білок	Альбумін	Альбумін Заг. білок	Креатинін	Сечовина
15	0	64,8±3,64	36,7±4,47	0,57	90,2±1,94	9,02±0,25
	0,1	54,5±1,41*	28,7±0,42*	0,52	95,7±1,91*	9,30±0,20
	1	58,7±2,23*	30,3±1,38*	0,52	86,6±2,80*,**	8,80±0,20**
36	0	62,60±3,93	37,0±2,83	0,59	88,3±3,59	8,58±0,29
	0,1	55,7±2,43*	28,3±0,95*	0,51	90,7±3,59	9,30±0,50*
	1	65,4±3,64**	36,7±4,47	0,50	81,8±2,65*,**	8,60±0,30**

Примітка: у цій і в усіх подальших таблицях: * – зміни вірогідні ($p < 0,05$) у порівнянні з контролем; ** – зміни вірогідні ($p < 0,05$) у порівнянні з дозою 0,1 мкг Cd^{2+} /кг маси.

Так, в середньому, за дією обох доз Cd^{2+} вміст загального білка у сироватці знижується протягом всього часу експерименту. Таким чином, і використовувані дози, і час їх дії призводять до пригнічення синтезу білка в організмі тварин, що корелює із затримкою їх росту (табл. 1). При цьому вміст у загальному білку найбільшої його фракції – альбуміну – також зменшується, що свідчить про зміну фракційного складу сироваткових білків. Серед різних органів, патології яких призводять до гіпопротеїнемії і зсуву цього складу, важливе місце займають порушення функцій печінки і нирок. Вміст креатиніну в крові під впливом дози 1 мкг Cd^{2+} /кг маси знижується і на 15-у, і на 36-ту добу, що може вказувати на зрушення білкового обміну в м'язовій тканині (Камышников, 2007; Макаров и др., 2013). На тлі цих змін вміст сечовини в сироватці залишається постійним протягом всього експерименту, що може вказувати на зрушення узгодженості між різними сторонами білкового обміну.

Зміни характеру білкового обміну, перш за все у печінці та нирках, підтверджуються і зниженням активності AST і ALT, найбільш вираженим за дії дози 1 мкг Cd²⁺/кг маси протягом 36 діб. При цьому коефіцієнт де Рітіса (AST/ALT) не змінюється протягом усього часу дії обох доз, що свідчить про синхронну зміну активності цих ферментів (табл. 3). Активність ALP протягом експерименту теж різко, принаймні вдвічі, знижується при дозі 1 мкг Cd²⁺/кг маси (табл. 3). Оскільки ізоформа, присутня в сироватці, знаходиться головним чином, в печінці і кістках, це вказує на зниження процесів дефосфорилування в цих тканинах. У кістках, зокрема, це може призводити до їх демінералізації (Lum, 1995). У проведених експериментах не виявлено впливу Cd²⁺ на вміст Ca²⁺ у сироватці крові.

Таблиця 3.

Вплив Cd²⁺ (мкг/кг маси) на активності ALT (Од/л), AST (Од/л), ALP(Од/л) і вміст Ca²⁺ (мМ/л) у сироватці крові щурів

Доба	Доза	Показники				
		AST	ALT	AST/ALT	ALP	Ca ²⁺
15	0	257,5±12,2	68,65±2,46	3,75	665,2±32,1	2,17±0,24
	0,1	246,7±19,1	74,83±1,68*	3,30	725,6±19,5*	2,26±0,13
	1	267,7±22,8	73,77±1,58*	3,63	666,1±29,2**	2,14±0,21
36	0	195,8±15,6	59,66±1,70	3,28	630,5±42,8	2,17±0,25
	0,1	174,5±5,6*	54,67±1,52*	3,20	518,3±17,7*	1,84±0,41
	1	172,9±4,1*	50,32±4,14*	3,44	382,4±26,9***	1,93±0,24

Доза 1 мкг Cd²⁺/кг маси, яку тварини отримували протягом 36 діб, привела до збільшення вмісту загального холестерину і тригліцеридів у сироватці в 1,5 і 1,3 рази відповідно (табл. 4), що є ризиком атеросклерозу і захворювань коронарних артерій.

Таблиця 4.

Вплив Cd²⁺ (мкг/кг маси) на вміст загального холестерину (мМ/л) і тригліцеридів (мМ/л) у сироватці крові щурів

Доба	Доза	Показники	
		Загальний холестерин	Тригліцериди
15	0	1,13±0,04	0,85±0,06
	0,1	1,15±0,05	0,74±0,08
	1	1,15±0,04	0,87±0,14
36	0	1,08±0,03	0,84±0,09
	0,1	1,12±0,04	0,77±0,03
	1	1,66±0,03***	1,06±0,08***

Цікаво, що раніше у морських свинок було виявлено аналогічні зміни білкового та ліпідного обміну при дії значно більших доз Cd²⁺ – 2мг/кг маси протягом 30 діб (Hristev et al., 2008). Таким чином, накопичення в організмі щурів Cd²⁺ у кількості, у 2000 разів меншій, ніж 2мг/кг маси і у 5 разів меншій, ніж MRL, призводить до якісно подібних спотворень у них показників загального обміну.

Нирки відіграють значну роль в метаболізмі багатьох гормонів, зокрема, тиреоїдних (Katz et al., 1975; Vasu, Mohapatra, 2012). Тому, в зв'язку з виявленими особливостями порушень білкового обміну в нирках, було вивчено вміст цих гормонів в сироватці крові в умовах дії Cd²⁺ (табл. 5). Обидві дози призводять до підвищення вмісту TSH у сироватці і на 15-у, і на 36-у добу та до зниження T₄ на 15-у, причому тенденція до його подальшого зниження зберігається до 36-ї доби. Таким чином, навіть при зсуві абсолютних значень концентрації TSH і вільного T₄ між вмістом цих гормонів у крові зберігається стандартна обернено пропорційна залежність.

Cd²⁺ індукуює розвиток оксидативного стресу. І доза I, і доза II підвищують у сироватці до 15-ї доби вміст 8-ізопростану у 1,9 і 2,4, а до 36-ї – у 2 і 3,7 разів відповідно. Аналогічно, хоча і з меншим приростом збільшується в ці терміни рівень карбонілювання білків сироватки. Протидією

цьому є не занадто велике зростання активності CAT і лише тенденція до підвищення активності SOD (табл. 6).

Таблиця 5.

Вплив Cd²⁺ (мкг/кг маси) на вміст TSH (мОд/мл) і вільного T₄ (пг/л) у сироватці крові щурів

Доба	Доза	Показники	
		TSH	T ₄
15	0	0,49±0,04	20,22±1,30
	0,1	0,47±0,04	16,60±0,30*
	1	0,89±0,27*	14,50±2,10*
36	0	0,43±0,06	18,44±1,11
	0,1	0,86±0,06*	17,20±0,70*
	1	0,70±0,17*	16,10±1,90*

Таблиця 6.

Вплив Cd²⁺ (мкг/кг маси) на вміст 8-ізопростану (пг/мл), карбонільованих білків (нМ/мл), активності SOD (од/мл/мін) і CAT (мкМ H₂O₂/мл/мін) у сироватці крові щурів

Доба	Доза	Показники			
		8-ізопростан	Карбонільовані білки	SOD	CAT
15	0	3,72±0,48	13,81±0,66	1,01±0,24	2,71±0,35
	0,1	7,01±0,19*	14,37±0,68	0,87±0,01*	4,36±0,66*
	1	8,98±0,48***	15,67±0,71*	1,17±0,24**	2,81±0,08***
36	0	3,91±0,65	12,07±0,48	0,87±0,05	3,80±0,75
	0,1	7,98±0,33*	17,10±1,05**	0,96±0,01*	5,11±0,38*
	36	14,49±0,64***	19,06±0,90***	1,04±0,02***	3,21±0,09***

Висновки

1. Введення 3-місячним щурам *per os* Cd²⁺ в дозах 0,1 і 1 мкг/кг маси протягом 36 днів призводить спочатку до зниження маси тіла, а після досягнення мінімуму – до його зростання. У 36 днів кінцева маса тіла піддослідних тварин нижче, ніж у контрольних.

2. За дією обох доз Cd²⁺ у сироватці крові піддослідних тварин знижуються показники білкового та ліпідного обміну, підвищується вміст TSH, зменшується – вільного T₄ та індукується розвиток оксидативного стресу.

3. Ступінь вираження цих ефектів вище за дії дози 1, ніж 0,1 мкг/кг маси тіла тварин.

Список літератури

Авдеева О.И., Ходько С.В., Рыбакова А.В., Ковалева М.А. Биометрические показатели. Динамика веса экспериментальных животных в онтогенезе // В кн.: Доклинические исследования. Справочник. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных. – СПб: Изд-во «ЛЕМА», 2013. – С. 12–16. /Avdeyeva O.I., Khod'ko S.V., Rybakova A.V., Kovaleva M.A. Biometricheskiye pokazateli. Dinamika vesa eksperimentalnykh zhivotnykh v ontogeneze // V kn.: Doklinicheskiye issledovaniya. Spravochnik. Fiziologicheskiye, biokhimicheskiye i biometricheskiye pokazateli normy eksperimentalnykh zhivotnykh. – Spb: Izd-vo "Lema", 2013. – S.12–16./

Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження» №3447-IV від 21.02.2006. – ВВР. – 2006. – №27. – Ст.230. /Zakon Ukrainy «Pro zakhyst tvaryn vid zhorstokogo povodzhennya». – No. 3447-IV vid 21.02.2006. – VVR. – 2006. – No. 27. – St.230./

Зміни, внесені до Закону №3447-IV згідно із Законом №1759-VI від 15.12.2009. – ВВР. – 2010. – №9. – Ст.76. /Zminy, vneseni do zakonu No. 3447-IV zgidno iz Zakonom No. 1759-VI vid 15.12.2009. – VVR. – 2010. – St.76./

Камышников В.С. Клинические лабораторные тесты от А до Я и их диагностические профили: Справочное пособие. – М.: «МЕДпресс-информ», 2007. – 320с. /Kamyshnikov V.S. Klinicheskiye laboratornyye testy ot A do Ya i ikh diagnosticheskkiye profili: Spravochnoye posobiye. – M.: MEDpress-inform, 2007. – 320s./

Комплекты реагентов Xema-Medica. 2015. (<http://xemamedica.com/html/reagents/xema/>)

Макаров В.Г., Абрашова Т.В., Соколова А.П., Ковалева М.А. Биохимические показатели. Методы оценки биохимических показателей крови. // В кн. Доклинические исследования. Физиологические,

- биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных. – СПб: Изд-во «ЛЕМА», 2013. – С. 44–45, 51–59, 62, 64, 68. /Makarov V.G., Abrashova T.V., Sokolova A.P., Kovaleva M.A. Biochimicheskiye pokazateli. Metody otsenki biokhimicheskikh pokazateley krovi // V kn.: Doklinicheskiye issledovaniya. Spravochnik. Fiziologicheskkiye, biokhimicheskiye i biometricheskkiye pokazateli normy eksperimentalnykh zhivotnykh. – SPb: Izd-vo "Lema", 2013. – S. 44–45, 51–59, 62, 64, 68./
- Наборы производства DAC-SPECTROMED, 2015. (http://www.micromed.ua/product-category/produkcija_dlya_laboratoriy/serologicheskie_lateks_testi_agglutinacionnie_testi_proizvodstva_dac_spectromed_moldova/)
- Basu G., Mohapatra A. Interactions between thyroid disorders and kidney disease // Indian J. Endocrinol. Metab. – 2012. – Vol.16 (2). – P. 204–213.
- Catalase Assay Kit. 2017. (<https://www.caymanchem.com/pdfs/707002.pdf>)
- Cuypers A., Plusquien M., Remans T. et al. Cadmium stress: an oxidative challenge // Biometals. – 2010. – Vol.23 (5). – P. 927–940.
- Hristev H., Penkov D., Hallak A.K. et al. Serum protein changes in rabbits after chronic administration of lead and cadmium // J. Cent. Eur. Agric. – 2008. – Vol.9 (1). – P. 141–145.
- 8 isoprostane ELISA Kit. Instructions for Use. A competitive immunoenzymatic assay for the quantitative measurement of 8 isoprostane in urine, serum, plasma, cells and tissues. Abcam, 2013. ([http://www.abcam.com/ps/products/175/ab175819/documents/ab175819%20-%208%20isoprostane%20ELISA%20Kit%20-%20protocol%20\(website\).pdf](http://www.abcam.com/ps/products/175/ab175819/documents/ab175819%20-%208%20isoprostane%20ELISA%20Kit%20-%20protocol%20(website).pdf))
- Glantz S.A. Primer of biostatistics. 4th edition. – McGraw-Hill, 2007. – 298p.
- Greene S.A. Veterinary anesthesia and pain management secrets. – Henlay & Belfuc Inc., 2002. – P.266.
- Katz A.I., Emmanouel D.S., Lindheimer M.D. Thyroid hormone and the kidney // Nephron. – 1975. – Vol.15. – P. 223–249.
- Lum G. Significance of low serum alkaline phosphatase activity in a predominantly adult male population // Clin. Chem. – 1995. – Vol.41 (4). – P. 515–518.
- Nair A.R., DeGheselle O., Smeets K. et al. Cadmium-induced pathologies: where is the oxidative balance lost (or not)? // Int. J. Mol. Sci. – 2013. – Vol.14 (3). – P. 6116–6143.
- Protein Carbonyl Content Assay Kit. 2011. (<http://www.interchim.fr/ft/G/GV7160.pdf>)
- Superoxide Dismutase Assay Kit. 2016. (<https://www.caymanchem.com/pdfs/706002.pdf>)
- Toxicological Profile for Cadmium. U.S. Department of Health and Human Services, 2012. (<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp5.pdf>)
- Tribowo J.A., Arizal M.H., Nashrullah M. et al. Oxidative stress of cadmium-induced ovarian rat toxicity // International Journal of Chemical Engineering and Applications. – 2014. – Vol.5, no. 3. – P. 254–258.

Представлено: О.П.Білозоров / Presented by: A.P.Belozorov
Рецензент: Н.І.Буланкіна / Reviewer: N.I.Bulankina
Подано до редакції / Received: 05.11.2017