

УДК 577.128:612.12:615.9:546.81:636.028-055.26

Н.М. Мельникова, І.А. Лазаренко, І.А Шепельова
**АМИНОКИСЛОТНИЙ СКЛАД КРОВІ ЩУРІВ ОТРУЄНИХ РІЗНИМИ
ДИСПЕРСНИМИ ФОРМАМИ СВИНЦЮ**

Національний університет біоресурсів і природокористування України

Досліджено кількісний та якісний склад вільних амінокислот крові щурів. Виявлено різноспрямовані зміни замісних та незамісних амінокислот в крові щурів при отруєнні макродисперсною та наноформою свинцю. Встановлено вірогідне зниження вмісту незамісних амінокислот при отруєнні свинцем в різних дисперсних формах.

Ключові слова: макродисперсна форма свинцю, наноформа свинцю, амінокислоти, кров.

Н. М. Мельникова, И. А. Лазаренко, И.А Шепелева
**АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ КРОВИ КРЫС ОТРАВЛЕННЫХ РАЗЛИЧНЫМИ
ДИСПЕРСНЫМИ ФОРМАМИ**

Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины

Исследованы количественный и качественный состав свободных аминокислот крови крыс. Выявлены разнонаправленные изменения заменимых и незаменимых аминокислот в крови крыс при отравлении макродисперсной и наноформой свинца. Установлено достоверное снижение содержания незаменимых аминокислот при отравлении свинцом в разных дисперсных формах.

Ключевые слова: макродисперсная форма свинца, наноформа свинца, аминокислоты, кровь.

N.M. Melnikova, I.A. Lazarenko, I.A. Shepelova
**AMINO ACID COMPOSITION OF BLOOD OF RATS POISONED DIFFERENT
DISPERSE FORMS OF LEAD**

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine

The quantitative and qualitative composition of free amino acids levels in rats' blood were investigated. Some different-change replacement and essential amino acids in rat blood under poisoning of makrodyspersed nanoform lead were revealed. The significant decrease of essential amino acids under lead poisoning was detected in various dispersed forms.

Key words: macrodispersed form of lead, lead nanoform, amino acids, blood

Систематичне надходження в довілля малих кількостей токсичних речовин, зокрема важких металів, спричиняє зміни геохімічного середовища. Біологічні ефекти такого впливу, зводяться до адаптивних або патологічних змін в організмі, що призводить до порушення обміну речовин, імунологічного стану, нейрогуморальних систем, генетичної структури. Зовнішній вплив ксенобіотиків може викликати незворотні зміни функціонування організму, і раніше збалансована система втрачає динамічну рівновагу (Ткаченко та ін., 2008; Трахтенберг и др., 2010). Свинець займає провідне місце серед таких забруднювачів. Його сполуки прямо – шляхом дії на ензими, чи опосередковано – шляхом утворення регуляторних сполук, здатні змінювати інтенсивність та спрямованість метаболізму білків. Останні, як відомо, є одними з основних структурних і метаболічних чинників адаптацій. Відомо, що основними інтермедіатами білкового обміну є амінокислоти, які слугують резервом



для синтезу білків та нуклеїнових кислот, а також беруть участь у субстратному забезпеченні ліпогенезу та глюконеогенезу, зв'язуванні аміаку, виконують функції нейромедіаторів, використовуються як джерело енергії (Мельникова та ін., 2010; Шепельова та ін., 2006). Окремі з них беруть активну участь у детоксикації шкідливих для організму речовин, таких як важкі метали, пестициди та інші ксенобіотики. Тому, вміст амінокислот у крові тварин залежить від багатьох чинників і в тому числі від віку, стресових факторів, фізіологічного стану, швидкості їх утилізації та біосинтезу (Изучение..., 2002; Фисинин, 1997).

Ще більшої актуальності питання впливу свинцю на живий організм набуло з розвитком та впровадженням нанотехнологій у народне господарство, а тим самим – можливий негативний вплив наночастинок важких металів на організм людини та тварин (Демецька, 2010). За маленького розміру наночастинок важких металів більшість їх атомів знаходиться на поверхні і, таким чином, впливають на хімічні, фізичні та біологічні властивості речовин (Проданчук и др., 2009). Як відомо велика питома поверхня наноматеріалів, яка збільшує їх адсорбційну ємність, хімічну реакційну здатність і каталітичні властивості, призводить до збільшення продукції вільних радикалів і активних форм кисню та пошкодження біологічних структур (Нанотоксикологія..., 2009) . Нині встановлено, що наночастинок внаслідок своїх унікально малих розмірів, можуть зв'язуватися з нуклеїновими кислотами , білками, вбудовуватися в мембрани, проникати в клітинні органели і тим самим змінювати функції біоструктур (Марченко та ін., 2011).Також припускається можливість впливу продуктів нанотехнології на генні структури і механізми синтезу білку (Демецька, 2010; Марченко та ін., 2011).

Такі особливості наночастинок важких металів вимагають проведення різносторонніх досліджень з вивчення фізіологічних, біохімічних та біофізичних механізмів дії наночастинок на різні органи і системи організму, на функцію мембран клітин, мітохондрій, рибосом, ферментів, ДНК, РНК (Проданчук и др., 2009; Нанотоксикологія..., 2009).

Враховуючи вищесказане метою роботи було визначення рівня вільних амінокислот у крові щурів при отруєнні макродисперсною та наноформою свинцю.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження по вивченню амінокислотного 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.

Вміст амінокислот у зразках крові визначали методом рідинної іонообмінної хроматографії (Камышников, 2009) на амінокислотному аналізаторі ААА Т-339М фірми “Мікротехна” (Чехія). 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 із використанням t-критерію Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Відомо, що вільні амінокислоти крові в багатьох випадках слугують маркерами повноцінного живлення та порушення функціонального стану організму, так як відіграють важливу роль в процесі синтезу білка, фізіологічно активних сполук, пуринових та піримідинових основ, нуклеїнових кислот (Шепельова та ін., 2006).

При дослідженні амінокислотного складу крові щурів усіх дослідних груп виявлено 19 амінокислот: аланін, аргінін, аспарагінова кислота, валін, гістидин, гліцин, глутамінова кислота, ізолейцин, лейцин, лізин, метіонін, пролін, серин, тирозин, треонін, орнітин, фенілаланін, цистин, глютамін та встановлені різноспрямовані зміни їх вмісту при отруєнні свинцем в різних дисперсних формах.

Як видно з рис.1 вміст незамінних амінокислот у крові щурів отруєних макродисперсною та наноформою свинцю вірогідно знизився, порівняно з цим показником у щурів інтактною групи. Це може свідчити про посилений транспорт та використання незамінних амінокислот для нормалізації синтезу білка в організмі (Фисинин, 1997; Шепельова та ін., 2006; Chawla, 1990).

Аналізуючи вміст окремих амінокислот у крові щурів отруєних макродисперсною та наноформою свинцю, відмічено вірогідне зниження вмісту лізину в 1,53 та 1,73 рази, треоніну на 31,01 та 18,52 %, валіну на 33,96 та 19,06%, лейцину на 25,89 та 25,97% відповідно, у порівнянні з інтактною групою тварин. Оскільки вказані амінокислоти є маркерними для синтезу білків (Washabau, 2010), то отримані дані можливо вказують на підвищення інтенсивності синтезу останніх. В цілому, виявлені зміни свідчать про посилення катаболізму білків за інтоксикації та повну мобілізацію амінокислот в адаптивні процеси (Изучение..., 2002; Washabau, 2010).

Аналізуючи рівень заміних амінокислот у крові щурів отруєних макродисперсною та наноформою свинцю, виявлено підвищення вмісту цистину в 11,5 та 5,8 рази, глютаміну в 1,8 та 2,5 рази, орнітину в 1,4 та 2,5 рази, проліну на 16,72 та 45,86%, тирозину – 19,97 та 24,6%, та зниження рівня глютамінової кислоти в 1,6 та 1,7 рази, аланіну на 21,24 та 30,91% відповідно, у порівнянні з їх рівнем у щурів інтактною групи. Виявлене збільшення вмісту сірковмісної амінокислоти – цистину очевидно, пов'язано з його участю в процесах детоксикації і може розглядатись як прояв захисної реакції гепатоцитів на введення важкого металу. Авторами робіт показано, що інгібування реакції утилізації сірковмісних амінокислот є однією з найбільш ранніх ознак порушення функціонування печінки (Изучение..., 2002; Шепельова та ін., 2006).

Також відмічено різноспрямовані зміни вмісту гістидину. Так, при отруєнні макродисперсною формою свинцю, його вміст знизився на 26,19%, а при задаванні наноформи – підвищився на 28,57%. Відомо, що гістидин – природний інгібітор розкладу перекисів жирних кислот (Изучение..., 2002), необхідний для утворення червоних і білих клітин крові, захищає організм від шкідливої дії радіації, сприяє виведенню важких металів із організму. Тому, підвищення рівня гістидину в крові щурів отруєних наноформою свинцю, можливо зумовлено прискоренням катаболічних процесів, що відбуваються внаслідок інтоксикації свинцем. Але більш за все вільний гістидин з'являється у значних кількостях можливо внаслідок виходу гемоглобіну з еритроцитів та його руйнування (Шепельова та ін., 2006).

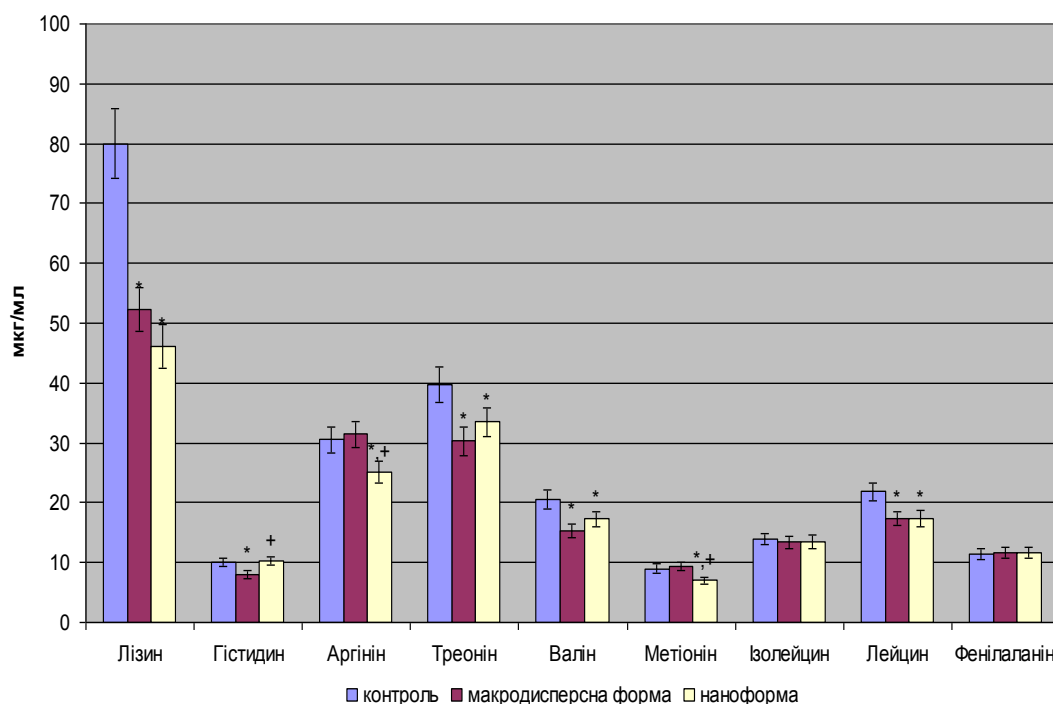


Рис. 1. Вміст незамінних амінокислот у крові щурів, отруєних макродисперсною та наноформою свинцю

* - $p < 0,05$ порівняно з інтактними тваринами; + - $p < 0,05$ порівняно зі щурами, отруєними макродисперсною формою свинцю.

При отруєнні наноформою свинцю вміст аргініну та метіоніну знижувався на 21,38 та 28,80% відповідно, порівняно з контролем, а при задаванні макродисперсної форми свинцю вірогідних змін вказаних амінокислот не відбувалося. Такі зміни аргініну пояснюються тим, що він здатний виступати у ролі антиоксиданта і потужного імуномодулятора (Шепельова та ін., 2006; Chawla, 1990), а також попередника біосинтезу поліамінів, що регулюють процеси проліферації клітин в організмі. Таким чином зниження вмісту аргініну під впливом наночастинок свинцю приводить до пригнічення імунної та адаптивних систем організму. Виявлені зміни метіоніну можуть бути свідченням блокування SH-груп іонами свинцю, що призводить до розпаду білкової молекули (Фисинин, 1997; Шепельова та ін., 2006).

Відомо, що глутамін в організмі є резервною та транспортною формою аміаку, і підвищення його концентрації в крові, очевидно, є свідченням посилення глутамінсинтетичної функції печінки отруєних щурів (Шепельова та ін., 2006; Chawla, 1990). Вірогідне зростання вмісту тирозину, можливо пояснюється його здатністю зв'язуватись із токсикантами, у даному випадку зі свинцем, знижуючи таким чином їх токсичність і сповільнюючи біотрансформацію (Шепельова та ін., 2006). Встановлені зміни вмісту орнітину та проліну можуть вказувати на суттєві порушення енергетичного обміну на стадії циклу Кребса (Изучение..., 2002). Відомо, що глутамінова кислота вступає в реакцію з аміаком у процесі синтезу глутаміну. В цьому циклі проходить стадія гідролізу однієї фосфатної молекули АТФ. Як відомо свинець,

порушує енергетичний обмін в організмі, а тому можливо опосередковано виступає в ролі активатора на стадії АТФ-гідролізної реакції, в результаті чого глутамінова кислота підвищено використовується для синтезу глутамату і, як наслідок знижується її концентрація в крові отруєних щурів, що підтверджують результати наших досліджень. Вірогідне зниження аланіну у крові щурів, за дії різних дисперсних форм свинцю, можливо вказує на посилене використання цієї амінокислоти за інтоксикації, зокрема, у глюкозо-аланіновому циклі.

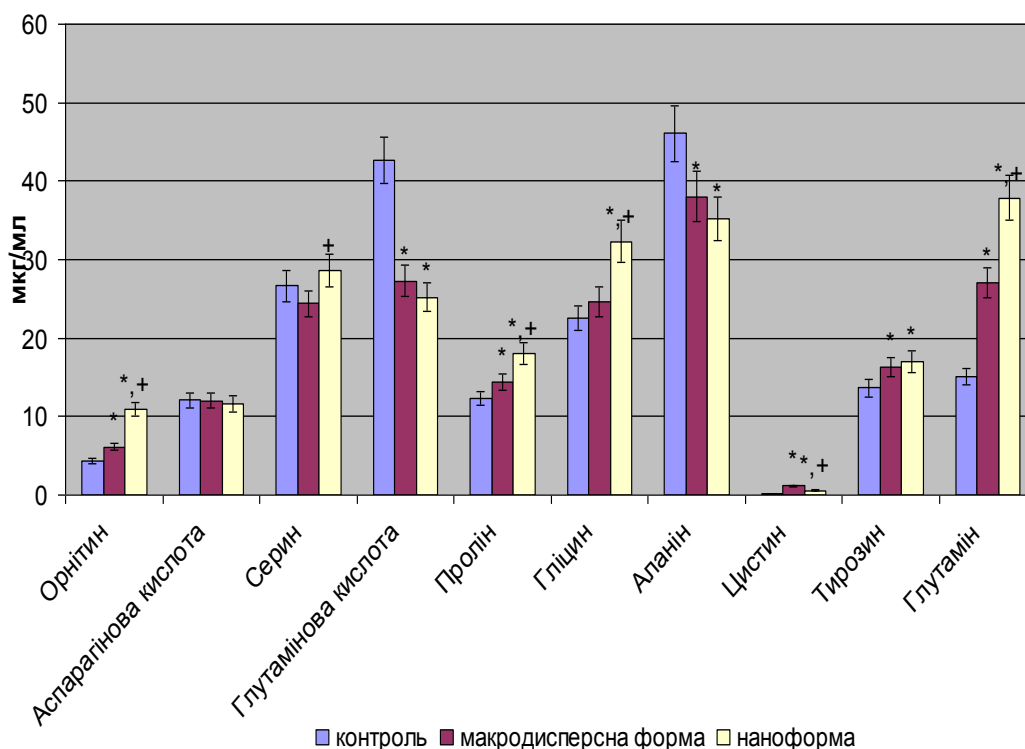


Рис. 2. Вміст замінних амінокислот у крові щурів, отруєних макродисперсною та наноформою свинцю.

* - $p < 0,05$ порівняно з інтактними тваринами; + - $p < 0,05$ порівняно зі щурами, отруєними макродисперсною формою свинцю.

Оскільки гліцин є нейромедіаторною амінокислотою і рецептори до нього є в багатьох ділянках головного та спинного мозку, він чинить «гальмівний» вплив на нейрони, зменшує виділення з нейронів «збуджуючих» амінокислот, таких як глутамінова кислота (Изучение..., 2002). Тому збільшення рівня гліцину в крові щурів отруєних наноформою свинцю на 43,69 % порівняно з інтактними тваринами, може свідчити про порушення в головному та спинному мозку, що підтверджує гіпотезу про полегшене проникнення наночастинок свинцю через гематоенцефалічний бар'єр. При цьому вміст вказаної амінокислоти в групі тварин отруєних макродисперсною формою не мав вірогідних змін.



ВИСНОВКИ

1. Дослідження амінокислотного спектру крові інтактних щурів та отруєних різними дисперсними формами свинцю, виявили 19 вільних амінокислот.
2. Встановлено достовірне зниження вмісту незамінних амінокислот у крові щурів отруєних свинцем в макродисперсній та наноформі, зокрема за рахунок зменшення вмісту лізину, треоніну, валіну та лейцину.
3. Відмічено особливості змін вмісту аргініну та метіоніну у крові щурів за умов отруєння наноформою свинцю.
4. Виявлено різноспрямовані зміни рівня заміних амінокислот у крові щурів отруєних різними дисперсними формами свинцю, зокрема підвищення вмісту цистину, глутаміну, орнітину, проліну і тирозину та зниження вмісту глутамінової кислоти й аланіну.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- Демецька, О. В. (2010). Проблема безпеки при використанні нанотехнологій. *Довкілля і здоров'я*, 4, 8-12.
- Жабицкая, Е. Д., Штеменко, Н. И., Пупченко, А. А., Сорочан, О.А. (2002). Изучение состава свободных аминокислот крови здоровых и больных анемией людей. *Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. Екологія*, 10, 13-15.
- Камышников, В.С. (2009). *Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. 3-е изд.* Москва: МЕДпресс-информ.
- Марченко, М.Л., Безденежник, Н.О., Фахмі, М. (2011). Вивчення цитотоксичної дії наночастинок металів на культурі клітин людини в експериментах *in vitro*. *Український журнал з проблем медицини праці*, 1, 63-70.
- Мельникова, Н. М., Ткаченко, Т. А., Лазаренко, І.А. (2010). Вміст кальцію в організмі щурів, отруєних свинцю ацетатом. *Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини*, 21(3), 191-194.
- Чекман, І.С., Сердюк, А. М., Кундієв, Ю. І. (2009). Нанотоксикологія: напрямки досліджень (огляд). *Довкілля та здоров'я*, 1, 3-7.

- Проданчук, Н.Г., Балан, Г.М. (2009). Нанотоксикология состояние и перспективы исследований. *Современные проблемы токсикологии*, 3-4, 4-20.
- Ткаченко, Т.А., Мельникова, Н. М. (2008). Біохімічні показники крові вагітних щурів за умов отруєння ацетатом свинцю. *Современные проблемы токсикологии*, 2, 25-27.
- Трахтенберг, И.М., Лубьянова, И. П., Апыхтина, Е. Л. (2010). Роль свинца и железа, как техногенных химических загрязнителей, в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний. *Therapia*, 7-8(49), 36-39.
- Фисинин, В.И. (1997). Биологический прогресс в питании птицы и некоторые практические аспекты. *С.-х. біологія*, 2, 112-121.
- Шепельова, І.А., Деркач, Є. А., Мельникова, Н. М. (2006). Амінокислотний склад крові та показники азотого обміну у щурів отруєних кадмію сульфатом. *Современные проблемы токсикологии*, 4, 35-37.
- Шепельова, І.А., Деркач, Є. А., Мельникова, Н. М. (2006б). Вплив кадмію на вміст вільних амінокислот та активність трансаміназ у крові щурів різного віку. *Науковий вісник Львівської національної академії ветеринарної медицини ім. С.З. Гжицького*, 8(29), 188-191.
- Chawla, R. K., & Bonkovsky, H. L. (1990). Biochemistry and pharmacology of S-adenosyl-L-methionine and rationale for its use in liver disease. *Drugs*, 3, 98-110.
- Washabau, R. (2010). Laboratory Tests for Liver Disease. *Veterinary Focus*, 20(3), 32-37.

REFERENCES

- Demetska, A. (2010). Problem of safety in nanotechnology. *Environment and Health*, 4, 8 - 12.



- Zhabitskaya, E.D., Shtemenko, N.I., Pupchenko, A.A., & Sorochan, O.A. (2002). The study of free amino acids and the blood of healthy people with anemia. *Bulletin of Dnipropetrovsk University, Biology. Ecology*, 10, 13-15.
- Kamyshnikov, V.S. (2009). *Handbook of clinical and biochemical laboratory diagnosis*. Moscow: MEDpress-Inform.
- Marchenko, M.L., Bezdenezhnyk, N.A., & Fahmy, M. (2011). The study of cytotoxic effect of nanoparticles of metals in human cell culture experiments in vitro. *Ukrainian Journal of Occupational Health issues*, 1, 63-70.
- Melnikova, N.M., Tkachenko, T.A., & Lazarenko, I.A. (2010). The content of calcium in rats poisoned lead acetate. *Problems zooinzheneriy and veterinary medicine*, 3(21), 191-194.
- Checkman, I.S., Serdyuk, A.M., ...Kundiyeu, Y. (2009). Nanotoxicology: research directions (review). *Environment and Health*, 1, 3-7.
- Prodanchuk, N.G., & Balan, G.M. (2009). Nanotoxicology state and prospects of research. *Modern Problems of Toxicology*, 3-4, 4-20.
- Tkachenko, T.A., & Melnikova, N.M. (2008). Biochemical parameters of blood of pregnant rats under poisoning lead acetate. *Current Problems of Toxicology*, 2, 25-27.
- Trachtenberg, I.M., Lubyanova, I.P., & Apyhtina, E.L. (2010). The role of lead and iron, as a man-made chemical pollutants in the pathogenesis of cardiovascular zabolivany. *Therapia*, 7-8(49), 36-39.
- Fisinin, V.I. (1997). Biological advances in nutrition of poultry and some practical aspects. *Agricultural Biology*, 2, 112-121.

Shepeleva, I.A., Derkach, E.A., & Melnikova, N.M. (2006a). Amino acid composition and blood parameters azotovoho exchange in rats poisoned cadmium sulfate. *Modern problems toksykolohyy*, 4, 35 - 37.

Shepeleva, I.A., Derkach, E.A., & Melnikova, N.M. (2006b). Effect of cadmium on the content of free amino acids and activity of enzymes in the blood of rats of different ages. *Scientific Bulletin of Lviv National Academy of Veterinary Medicine. Biotechnologies*, 8(2), 188-191.

Chawla, R.K., & Bonkovsky, H.L. (1990). Biochemistry and pharmacology of S-adenosyl-L-methionine and rationale for its use in liver disease. *Drugs*, 3, 98-110.

Washabau, R. (2010). Laboratory Tests for Liver Disease. *Veterinary Focus*, 20(3), 32-37.

© Н.М. Мельникова, І.А. Лазаренко, І.А Шепельова, 2012

© N.M. Melnikova, I.A. Lazarenko, I.A. Shepelova, 2012

Надійшла до редколегії 08.01.2012