

УДК: 577.112:612.112.94+636.3 : 546.815

СОДЕРЖАНИЕ МЕТАЛЛОТИОНЕИНОВ И ОБЩЕГО БЕЛКА В ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ОВЕЦ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ПОСТУПЛЕНИИ НИТРАТА СВИНЦА С РАЦИОНОМ

Э.Б. Мирзоев,
В.О. Кобялко,
И.В. Полякова,
О.А. Губина,
Н.А. Фролова

ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной радиологии и агроэкологии»
Россельхозакадемии, 249032,
г. Обнинск, Калужская обл.,
Российская Федерация

В лимфоцитах периферической крови овец, которые с рационом получали нитрат свинца в концентрациях 5; 25 и 150 мг/кг корма, определяли содержание общего белка и металлотионеинов. Образцы крови отбирали из яремной вены овец до кормления на 7-е, 14-е, 28-е, 42-е, 70-е и 90-е сутки исследования. Хроническое поступление свинца с рационом в организм овец характеризуется увеличением уровня металлотионеинов в лимфоцитах периферической крови при одновременном снижении их жизнеспособности. В то же время количество общего белка в начальные сроки интоксикации повышается, а в последующие – снижается. Определение содержания металлотионеинов в лимфоцитах периферической крови предлагается использовать как информативный показатель при оценке воздействия свинца на млекопитающих.

Ключевые слова: овцы, лимфоциты, периферическая кровь, металлотионеины, свинец.

Введение. Металлотионеины (МТ) – это низкомолекулярные белки (6–7 кДа), содержащие до 30% цистеина. В организме млекопитающих МТ связывают ионы тяжелых металлов (Cd, Zn, Pb, Hg, Cu), поддерживают гомеостаз меди и цинка и действуют как ловушка для свободных радикалов [1, 2]. Установлено, что ионы металлов по степени индукции синтеза МТ в печени мышей располагаются в последовательности: $Cd^{2+} > Pb^{2+} > Zn^{2+} > Hg^{2+} > Cu^{2+}$ [3].

В экспериментах на крысах показано, что хроническое и острое воздействие кадмия индуцирует синтез МТ в тканях органов при одновременном изменении концентрации малонового диальдегида, одного из конечных продуктов свободнорадикального ПОЛ [4, 5]. Воздействие свинца также характеризуется увеличением уровня МТ в тканях органов лабораторных животных и зависит от способа введения. Так, синтез Pb- и Zn- МТ в тканях органов мышей регистрировали при введении ацетата

свинца внутривенно и внутрибрюшинно, но не подкожно [6]. Повышение уровня МТ в тканях почек крыс отмечали при хроническом поступлении свинца с питьевой водой в концентрациях 200–300 мг/л [7]. Следует отметить, что основные закономерности индукции синтеза МТ установлены в тканях органов (печень, почки, селезенка) лабораторных животных. В то же время данные о содержании МТ в клетках периферической крови отсутствуют. Учитывая тот факт, что МТ являются белками, то при воздействии свинца на млекопитающих представляет научный и практический интерес определение в клетках крови общего количества белка. В связи с этим *целью исследования* стала оценка содержания МТ и общего белка в лимфоцитах периферической крови овец при хроническом поступлении нитрата свинца с рационом.

Материалы и методы исследования. Исследования были проведены на 12 овцах романовской

Мирзоев Эльдениз Балабек оглы (Mirzoev Eldeniz Balabek ogly), доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории радиобиологии и экотоксикологии сельскохозяйственных животных ГНУ ВНИИСХРАЭ, 249032, г. Обнинск, Калужская обл., mirzoev.ed@yandex.ru

Кобялко Владимир Олегович (Kobyalko Vladimir Olegovich), кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории радиобиологии и экотоксикологии сельскохозяйственных животных ГНУ ВНИИСХРАЭ, 249032, г. Обнинск, Калужская обл., kobyalko@yandex.ru

Полякова Ирина Владимировна (Polyakova Irina Vladimirovna), младший научный сотрудник лаборатории радиобиологии и экотоксикологии сельскохозяйственных животных ГНУ ВНИИСХРАЭ, 249032, г. Обнинск, Калужская обл., irinaamchenkina@mail.ru

Губина Ольга Александровна (Gubina Olga Aleksandrovna), научный сотрудник лаборатории радиобиологии и экотоксикологии сельскохозяйственных животных ГНУ ВНИИСХРАЭ, 249032, г. Обнинск, Калужской обл., Olgubina@yandex.ru

Фролова Наталья Александровна (Frolova Natalya Aleksandrovna), кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории радиобиологии и экотоксикологии сельскохозяйственных животных ГНУ ВНИИСХРАЭ, 249032, г. Обнинск, Калужская обл., nafco@yandex.ru.

породы, живой массой $33,0 \pm 1,1$ кг, в возрасте 1–1,5 года. Содержание, кормление и уход за животными осуществляли в соответствии с требованиями «Правил лабораторной практики» (Приказ Минздравсоцразвития России от 23.08.2010 г. №708н). Овец содержали в условиях вивария Государственного научного учреждения Всероссийского научно-исследовательского института физиологии, биохимии и питания. Кормили 2 раза в сутки при свободном доступе к воде. Рацион включал 0,3 кг комбикорма и 2 кг сена разнотравного. Рецепт комбикорма в %: ячмень – 44; пшеница – 41,4; шрот подсолнечный – 11,7; соль поваренная – 1; обесфторенный фосфат – 1; премикс – 1. Состав сена в %: сырое вещество – 87,9; жир – 2,26; клетчатка – 32,6; зола – 4,26; протеин – 8,89.

Животные были разделены на четыре группы по 3 головы в каждой. 1-я группа (интактные животные) служила контролем. Овцы 2-й, 3-й и 4-й групп ежедневно в течение 90 суток исследования получали с рационом нитрат свинца в концентрациях 5 мг/кг, 25 мг/кг и 150 мг/кг корма, соответственно. Содержание свинца в рационе животных 2-й группы соответствовало максимально допустимому уровню (МДУ) металла в кормах, 3-й группы – 5 МДУ, 4-й группы – 30 МДУ. Нитрат свинца задавали с комбикормом один раз в сутки с учетом количества корма (в среднем 2 кг), поступающего в желудочно-кишечный тракт. Для этого 100 г комбикорма смешивали с 50 мл раствора нитрата свинца необходимой концентрации. При этом суточное поступление металла на голову для овец 2-й группы составило 10 мг, 3-й группы – 50 мг, 4-й группы – 300 мг, а доза воздействия, соответственно, 0,3 мг/кг; 1,52 мг/кг и 9,1 мг/кг веса. Образцы крови брали из яремной вены овец до кормления на 7-е, 14-е, 28-е, 42-е, 70-е и 90-е сутки исследования. В качестве антикоагулянта использовали цитрат натрия.

Лимфоциты периферической крови животных выделяли методом центрифугирования в градиенте плотности фикоколл-пака [8, 9]. Жизнеспособность клеток определяли в тесте с трипановым синим. Содержание МТ в лимфоцитах периферической крови оценивали радиохимическим методом [10] в модификации [11], который основан на замещении ионов металла, хелатированных в МТ, радиоактивным ^{109}Cd . Общее количество белка в клетках определяли методом Лоури [12].

Статистическую обработку результатов проводили методом вариационной статистики с использованием *t*-критерия Стьюдента. Различия значений считали достоверными при $p < 0,05$ [13].

Результаты и обсуждение. Содержание МТ в лимфоцитах периферической крови интактных овец (контрольная группа) составило $138,5 \pm 9,3$ нг/ 10^7 клеток (рис. 1). У животных 2-й группы (1 МДУ) величина показателя возрастала в течение всего периода наблюдения относительно

контрольных и исходных данных на 98,9–160,8% и 62–112%, соответственно. Достоверные различия значений регистрировали в период с 14 по 90-е сутки интоксикации. С увеличением концентрации свинца в рационе отмечали более выраженный характер изменений. Так, у животных 3-й группы (5 МДУ) содержание МТ достоверно превышало значения контроля в период с 7-х по 90-е сутки исследования на 131,8–218,7%. Относительно исходных значений достоверные различия наблюдали с 14-х по 90-е сутки (88–139%). У животных 4-й группы (30 МДУ) содержание МТ было выше контрольных и исходных данных в период с 7-х по 90-е сутки на 181,1–384,1% и 85–218%, соответственно ($p < 0,05$).

Следовательно, хроническое поступление нитрата свинца с рационом в организм овец приводит к увеличению содержания МТ в лимфоцитах периферической крови. Наиболее выраженный характер изменений отмечали с ростом концентрации металла в рационе.

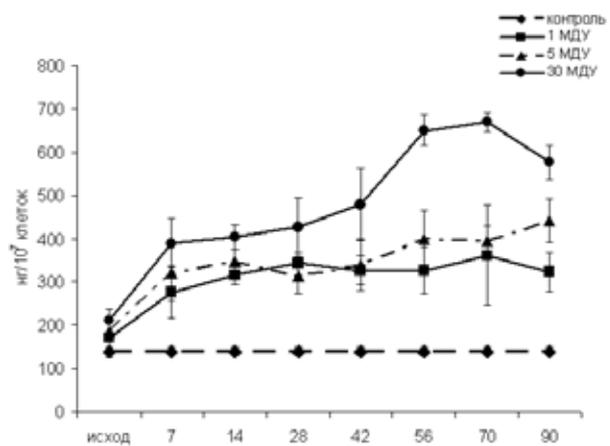


Рис. 1. Содержание МТ в лимфоцитах периферической крови овец при хроническом поступлении свинца с рационом в концентрациях 5; 25 и 150 мг/кг корма. МТ – металлотионеин; МДУ – максимально допустимый уровень; 1 МДУ – 5 мг/кг корма; 5 МДУ – 25 мг/кг корма; 30 МДУ – 150 мг/кг корма.

Определение общего количества белка в лимфоцитах периферической крови у интактных животных не выявило существенных изменений в течение всего периода исследования и в среднем составило $0,117 \pm 0,005$ нг/кл (рис. 2). В то же время у овец 2-й группы (1 МДУ) изменения величины показателя носили нелинейный характер. Так, на 7-е сутки регистрировали повышение уровня белка относительно контроля и исходных данных на 51,6% ($p < 0,05$) и 42% ($p < 0,05$), а на 90-е – снижение на 35,2% ($p < 0,05$) и 39% ($p < 0,05$), соответственно. Аналогичный характер изменений относительно контроля наблюдали у животных 3-й группы (5 МДУ). Хотя величина показателя была ниже исходных данных на 26% ($p < 0,05$) на 42-е сутки и на 34% ($p < 0,05$) на 90-е сутки интоксикации. У овец

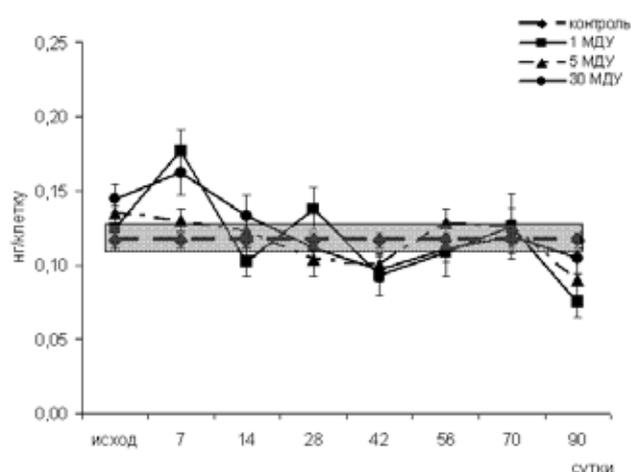


Рис. 2. Содержание белка в лимфоцитах периферической крови овец при хроническом поступлении свинца с рационом в концентрациях 5; 25 и 150 мг/кг корма.

4-й группы (30 МДУ) на 7-е сутки регистрировали достоверное увеличение количества белка в лимфоцитах на 38,7% относительно контроля, а в последующие сроки исследования – тенденцию к снижению. Следует отметить, что величина показателя была ниже исходных данных на 28-е, 48-е и 90-е сутки интоксикации на 23% ($p < 0,05$), 33% ($p < 0,05$) и 28% ($p < 0,05$), соответственно.

Следовательно, при хроническом поступлении нитрата свинца в организм овец с рационом количество общего белка в лимфоцитах периферической крови в начальные сроки интоксикации повышается, а в последующие – снижается.

Оценка жизнеспособности лимфоцитов периферической крови животных 2-й группы (1 МДУ) обнаружила тенденцию к уменьшению значений показателя в течение первых 42-х суток

интоксикации (табл. 1). На 56-е сутки регистрировали достоверное увеличение гибели клеток на 7%. В последующие сроки исследования жизнеспособность клеток была на уровне исходных и контрольных значений.

С ростом концентрации металла в рационе отмечали снижение жизнеспособности лимфоцитов в периферической крови. Так, у овец 3-й группы достоверное увеличение гибели клеток на 7–10% регистрировали в период с 42-х по 90-е сутки интоксикации. У животных 4-й группы жизнеспособность клеток была ниже исходных данных на 5–13% в период с 28-х по 90-е сутки исследования.

Следовательно, хроническое поступление нитрата свинца с рационом в организм овец приводит к снижению жизнеспособности лимфоцитов периферической крови. Наиболее выраженные изменения отмечали у животных 4-й группы, которые с рационом получали нитрат свинца в концентрации 150 мг/кг корма.

С увеличением количества свинца в рационе и продолжительности его поступления в организм овец возрастает уровень металла в периферической крови, что определяет в основном степень токсического действия на клеточные популяции. Изменения количества общего белка и содержания МТ в лимфоцитах периферической крови овец при хроническом поступлении нитрата свинца с рационом, в целом, отражают функциональное состояние клеток. Сравнительный анализ динамики изменений содержания общего белка и МТ в лимфоцитах периферической крови выявил различия. Так, изменения количества общего белка носили нелинейный характер: в начальные сроки интоксикации отмечали увеличение, а в последующие

Таблица 1

Жизнеспособность лимфоцитов периферической крови овец при хроническом поступлении свинца с рационом в концентрациях 5; 25 и 150 мг/кг корма, %

Сроки исследований, сутки	Контроль	2-я группа (1 МДУ)	3-я группа (5 МДУ)	4-я группа (30 МДУ)
Исходные данные	95,0±2,8	93,6±1,7	94,8±0,9	93,1±1,3
7	95,0±2,8	93,00±2,4	96,7±0,3	94,9±1,7
14	95,0±2,8	93,13±0,6	91,8±1,1	87,5±5,14
28	95,0±2,8	92,7±1,3	90,7±2,0	88,16±1,9
42	95,0±2,8	88,0±3,3	85,3±1,7*	83,1±1,5*
56	95,0±2,8	87,5±0,6*	88,7±0,9*	88,5±1,6
70	95,0±2,8	96,0±1,8	87,0±2,8	84,9±1,15*
90	95,0±2,8	93,9±1,8	88,17±2,1	81,2±1,6*

Примечание: * – достоверные различия значений, $p < 0,05$.

– снижение. В то же время уровень МТ в клетках возрастал в течение всего периода исследований. Следовательно, доля МТ в общем количестве белка возрастает с увеличением токсической нагрузки свинца на лимфоциты периферической крови. На основании полученных результатов предлагается использовать определение содержания МТ в лимфоцитах периферической крови как информативный показатель при оценке воздействия свинца на млекопитающих.

Выводы. Хроническое поступление с рационом в организм овец нитрата свинца в концентрациях 5 (1 МДУ), 25 (5 МДУ) и 150 (30 МДУ) мг/кг корма характеризуется увеличением уровня МТ в лимфоцитах периферической крови при одновременном снижении их жизнеспособности. В то же время количество общего белка в начальные сроки интоксикации повышается, а в последующие – снижается.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Klaasen C.D., Liu J., Diwan B.A. Metallothionein protection of cadmium toxicity // *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2009. V. 238. №3. P. 101–112.
2. Yu J., Fujishiro H., Oyama T.M., Hasegawa T., Seko Y., Miura N., Himeno S. Dichotomous effects of lead acetate on the expression of metallothionein in the liver and kidney of mice // *Biol. Pharm. Bull.* V. 32. P.1037–1042.
3. Пыхтева Е.Г. Изучение индукции металлотионеинов в печени мышей при внутрибрюшинном введении солей двухвалентных металлов // *Современные проблемы токсикологии пищевой и химической безопасности*, 2012. №1. С. 20–24.
4. Мирзоев Э.Б., Кобылко В.О., Губина О.А., Фролова Н.А. Ответная реакция организма крыс (поколение F₁) при хроническом воздействии кадмия в антенатальный и молочный период вскармливания // *Токсикологический вестник*, 2011. №4. С. 16–19.
5. Кобылко В.О., Мирзоев Э.Б., Губина О.А., Фролова Н.А., Ратникова Л.И., Анисимов В.С. Содержание металлотионеинов в печени и почках крыс разного возраста при внутрибрюшинном введении нитрата кадмия // *Токсикологический вестник*, 2011. №5. С. 16–19.
6. Maitani T., Watahiki A., Suzuki K.T. Induction of metallothionein after lead administration by

- three injection routes in mice // *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1986. V. 83. P. 211–217.
7. Wang L., Chen D.W., Wang H., Liu Z.P. Effects of lead and/or cadmium on the expression of metallothionein in the kidney of rats // *Biol. Trace Elem. Res.*, 2009. V. 129. P. 190–199.
8. Сунгуров А.Ю. Разделение и анализ клеток физическими методами / «Итоги науки и техники». ВИНТИ. Сер. «Цитология». 1985. Т.4. 145 с.
9. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood // *J. Clin. Invest.*, 1968. V. 21. P. 77–89.
10. Eaton D.L., Toal B.F. Evaluation of the Cd/Hemoglobin affinity assay for the rapid determination of metallothionein in biological tissues // *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1982. V. 66. P. 134–142.
11. Котеров А.Н., Требенюк З.А., Пушкарева Н.Б., Никольский А.В. Влияние цинк-металлотионеинов на перекисное окисление липидов в клетках костного мозга грызунов // *Радиационная биология. Радиоэкология*, 1998. Т. 38, Вып. 3. С. 426–430.
12. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.*, 1951. V. 193. P. 265–275.
13. Лакин Г.Ф. Биометрия: Учебное пособие для биол. спец. вузов. 4-изд., перераб. и доп. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.

REFERENCES:

1. Klaasen C.D., Liu J., Diwan B.A. Metallothionein protection of cadmium toxicity // *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2009; 238: (3): 101–112.
2. Yu J., Fujishiro H., Oyama T.M., Hasegawa T., Seko Y., Miura N., Himeno S. Dichotomous effects of lead acetate on the expression of metallothionein in the liver and kidney of mice // *Biol. Pharm. Bull.*, 2009; 32: 1037–1042.
3. Pykhteva E.G. The acute induction of metallothionein in the liver of mice under intraperitoneal introduction of divalent metals salts // *Sovremennye problemy toksikologii pischevoy i himicheskoy bezopasnosti.*, 2012; 1: 20–24 (in Russian).
4. Mirzoev E.B., Kobylko V.O., Gubina O.A., Frolova N.A. The response reaction of organism of rats (generation F₁) under the chronic exposure of cadmium in the antenatal and dairy period of feeding // *Toxicological Review.*, 2011; 4: 16–19 (in Russian).
5. Kobylko V.O., Mirzoev E.B., Gubina O.A., Frolova N.A., Ratnikova L.I., Anisimov V.S. Content of metallothioneins in liver and kidneys of rats different age at intra-abdominal administration of cadmium nitrate // *Toxicological Review*, 2011; 5: 18–21 (in Russian).
6. Maitani T., Watahiki A., Suzuki K.T. Induction of metallothionein after lead administration by

- three injection routes in mice // *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1986; 83: 211–217.
7. Wang L., Chen D.W., Wang H., Liu Z.P. Effects of lead and/or cadmium on the expression of metallothionein in the kidney of rats // *Biol. Trace Elem. Res.*, 2009; 129: 190–199.
8. Sungurov A. Yu. Separation and analysis of cells by physical methods / *Itoji nauki i tekhniki VINITI. Ser. «Tsitologiya»*, 1985; 4. (in Russian).
9. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood // *J. Clin. Invest.* 1968; 21: 77–89.
10. Eaton D.L., Toal B.F. Evaluation of the Cd/Hemoglobin affinity assay for the rapid determination of metallothionein in biological
- tissues // *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1982; 66:134–142.
11. Koterov A.N., Trebenok Z.A., Pushkareva N.B., Nikol'skii A.V. The effect of Zn-metallothionein on lipid peroxidation in rodent bone marrow cells // *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya*, 1998; 38 (3): 426–430 (in Russian).
12. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.*, 1951; 193: 265–275.
13. Lakin G.F. *Biometriya: Uchebnoye posobiye dlya biol. spets.vusov. 4 izd., pererab. i dop. M.: Visshaya shkola. 1990 (in Russian).*

E.B. Mirzoev, V.O. Kobylko, I.V. Polyakova, O.A. Gubina, N.A. Frolova

CONTENT OF METALLOTHIONEINS AND THE TOTAL PROTEIN IN SHEEP PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES UNDER CHRONIC DIETARY INTAKE OF LEAD NITRATE

State Scientific Institution» All-Russian Institute of Agricultural Radiology and Agroecology», Russian Academy of Agricultural Sciences, 249032 Obninsk, Kaluzhskaya region, Russian Federation

The content of the total protein and metallothioneins in peripheral blood lymphocytes of sheep which received lead nitrate with the diet in concentration of 5;25 and 150 mg/kg fodder was examined. Blood samples were taken from the sheep jugular vein before feeding on 7, 14, 28, 42, 70 and 90 days of investigation. The chronic intake of lead with the diet by the sheep organism is characterized by an increased level of metallothioneins in peripheral blood lymphocytes with simultaneous decrease of animals viability. At the same time, the amount of the total protein in the initial period of intoxication raises and in the subsequent periods decreases. Based on results obtained, it is suggested to use the determination of the metallothioneins content in peripheral blood lymphocytes as informative parameter to estimate mammals exposure to lead.

Key words: sheeps, lymphocytes, peripheral blood, metallothionein, lead.

Материал поступил в редакцию 06.02.2014 г.