

## Оценка антитоксического действия альфа-токоферола и наночастиц серебра при кадмиевом токсикозе

*Е.А. Ткаченко, аспирантка, М.А. Дерхо, д.б.н., профессор, ФГБОУ ВО Южно-Уральский ГАУ*

Кадмий (Cd), как представитель отрицательных антропогенных факторов, способствует снижению здоровья человека и животных на индивидуальном и популяционном уровнях, росту специфической патологии и появлению новых форм экологических болезней, так как влияет на строение и биологическую активность белков (в том числе и каталитических), скорость и направленность биохимических реакций, образование избыточных количеств промежуточных и конечных метаболитов и др. При этом структуры и клетки органов, в которых накопление элемента максимально, как правило, повреждаются в большей степени [1]. В связи с этим весьма актуальна проблема поиска препаратов, обладающих антитоксическим действием и способствующих выведению из живого организма Cd и других тяжёлых металлов. Известно, что наиболее часто при различных металлотоксикозах используют препараты антидотного типа действия, которые обезвреживают токсикант и ускоряют его выведение, что благотворно влияет на физиологический и метаболический статус организма, уровень его здоровья [2]. Определённую перспективу в качестве детоксикантов имеют вещества, которые одновременно обладают антитоксической, биологической и физиологической функциональностью, например биологически активные вещества. Их эффективность определяется тем, что они не являются чужеродными для живого организма,

метаболизируют в нём, проявляя биологические свойства на субклеточном, клеточном, органном и организменном уровнях.

**Цель** настоящего исследования – оценка изменений состава красной крови и морфологических характеристик эритроцитов на фоне применения  $\alpha$ -токоферола и наночастиц серебра при экспериментальном кадмиевом токсикозе животных.

**Материал и методы исследования.** Материалы, представленные в работе, являются результатом собственных исследований, получены в период 2013–2015 гг. на базе вивария и кафедры органической, биологической и физколлоидной химии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский ГАУ».

Объектом исследования служили половозрелые самцы белых лабораторных мышей с массой тела 22–24 г. Все животные находились в виварии на стандартном пищевом и водном рационе, при естественном освещении и свободном доступе к пище и воде. Для проведения эксперимента было сформировано три опытных группы мышей по 60 особей в каждой. I гр. служила фоном токсического действия кадмия на организм животных. С этой целью мыши I гр. ежедневно *per os* (в составе корма) получали  $\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$  в дозе 616,5 мг/кг. Во II гр. введение кадмия сочетали с добавлением в пищу мышей  $\alpha$ -токоферола ацетата в дозе 225 ИЕ/кг, а в III гр. – с добавлением в суточную дозу питьевой воды наночастиц серебра из расчёта 14 мг/кг.

Материал исследований (кровь) получали после декапитации мышей, которую проводили под наркозом эфира с хлороформом с соблюдением

принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации, до интоксикации, через 1, 3, 7 и 15 сут. интоксикации. Мазки крови изготавливали сразу после взятия материала, затем окрашивали по методу Романовского – Гимзы. Подсчёт эритроцитов проводили в камере Горяева, оценку морфологии эритроцитов – с помощью иммерсионного объектива. Концентрацию гемоглобина определяли с помощью набора реактивов «Клини Тест – Гем Ц». Среднее содержание гемоглобина в эритроците (МСН) рассчитывали по формуле:

$$МСН = \text{Hb} / \text{RBC},$$

где МСН – среднее содержание гемоглобина в эритроците, Пг;

Hb – количество гемоглобина, г/л;

RBC – количество эритроцитов в  $10^{12}/л$ .

Статистическую обработку данных проводили методом вариационной статистики на ПК с помощью табличного процессора «Microsoft Excel-2003» и пакета прикладной программы «Биометрия». Достоверность различий между группами оценивали с учётом непараметрического критерия Манна – Уитни.

**Результаты исследования.** Установлено, что экспериментальная Cd-интоксикация сопровождалась падежом животных. Так, в I опытной гр. в ходе опыта пало 10 особей, что составляло 16,7% от общего количества животных. Случаи смертности, в том числе и от каннибализма, наблюдались начиная с 8 сут. токсикоза. Во II опытной гр. пало только 2 мыши (3,3%), что произошло после 7 сут. эксперимента. В то же время в III гр. случаев падежа животных не было отмечено. Следовательно, Cd в организме животных опытных групп проявлял разную токсичность.

Исходя из того что большая часть Cd в крови млекопитающих концентрируется в основном в эритроцитах [3], мы оценили характер изменений основных гематологических показателей в ходе токсикоза у мышей опытных групп.

До интоксикации животные не имели существенных различий по уровню эритроцитов, Hb и величине МСН. В ходе токсикоза были уста-

новлены изменения гематологических параметров (табл. 1).

В крови экспериментальных мышей снижалось количество эритроцитов. Однако степень выраженности эритропении зависела от номера группы. Максимально количество клеток уменьшалось в организме животных I опытной гр., особенно в первые 3 сут. от начала токсикоза (на 34,9–43,5%;  $P > 0,05$ ), что, вероятно, было результатом внутрисосудистого гемолиза эритроцитов за счёт прямого действия кадмия. Аналогичные результаты были получены при введении  $CdCl_2$  per os крысам в дозе 10 мг/кг [3, 4]. По мнению А.А. Тугарева, уменьшение эритроцитов происходило за счёт снижения уровня их антиоксидантной защиты. В крови мышей II гр. количество эритроцитарных клеток понижалось менее значительно, но оно всё равно было на 30,8–34,3% ( $P > 0,05$ ) ниже значений «до интоксикации» и «норма». У животных III опытной гр. эритропения была отмечена только через сутки от начала поступления Cd в организм в составе корма. При этом количество клеток снижалось только на 20,3% ( $P > 0,05$ ) по сравнению с величиной «до интоксикации». Исходя из того что эритроциты определяют структуру кровотока в организме млекопитающих [4, 5], можно констатировать, что менее всего изменялась вязкость и текучесть крови у мышей III опытной гр.

Эритропения на фоне избыточного содержания кадмия в организме животных сопровождается гипохромемией. Однако одновременное снижение количества эритроцитов и гемоглобина в крови было установлено только у особей I опытной гр. через сутки после начала Cd-интоксикации. Во все остальные периоды исследования в крови мышей опытных групп уровень Hb обычно превышал не только значение «до интоксикации», но и верхнюю границу нормы (табл. 1). При этом наибольшее увеличение отмечено у особей в I, а наименьшее – у особей III опытной гр. Это, вероятно, было следствием повышения вязкости крови и вытеснения железа из Hb кадмием. В пользу данного предположения свидетельствовал тот факт, что Cd обладает большим сродством к Hb и образует в эритроцитах комплексы Cd-гемоглобин [4, 5].

1. Гематологические показатели (n = 10;  $X \pm Sx$ )

Показатель	Норма	Группа	До интоксикации	Длительность кадмиевой интоксикации, сут.			
				1	3	7	15
Эритроциты, $10^{12}/л$	8,5–10,5	I	8,50±0,26	5,53±0,11*	4,80±0,16*	6,44±0,20*	6,64±0,15*
		II	8,70±0,13	5,72±0,10*	6,02±0,25*	5,82±0,28*	5,82±0,13*
		III	8,58±0,22	6,84±0,11*	8,06±0,29	8,36±0,21	8,43±0,19
Гемоглобин, г/л	120–180	I	163,26±2,38	102,28±8,10*	178,51±3,07*	205,73±3,51*	233,08±5,98*
		II	167,92±2,68	181,11±4,27	219,9±8,18***	193,42±2,73***	216,07±6,35***
		III	164,06±1,02	183,8±2,77**	182,41±4,37**	155,06±2,81**	195,98±2,21*
МСН, Пг		I	19,20±1,15	18,49±2,65	37,18±0,72*	31,19±1,30*	35,10±1,60*
		II	19,30±0,95	32,20±1,94*	37,04±2,07*	33,88±1,59*	37,18±0,95*
		III	19,12±0,75	26,87±0,70*	22,63±1,12	18,54±0,31	23,24±0,90

Примечание: \* –  $P < 0,05$  по сравнению с величинами «до интоксикации»; \*\* –  $P < 0,01$ ; \*\*\* –  $P < 0,001$

Количество эритроцитов и Hb в крови определяют кислородную ёмкость крови, о которой можно судить по величине среднего содержания гемоглобина в эритроците (МСН). Согласно ранее полученным данным, значение МСН в ходе Cd-токсикоза снижается [5]. Однако мы отмечаем аналогичные изменения только в крови мышей I гр. через сутки опыта. При этом МСН уменьшалось на 3,83% по сравнению с уровнем «до интоксикации», как результат гемолиза эритроцитов за счёт прямого действия кадмия на клетки. Начиная с 3-х сут. величина МСН в крови мышей I гр. превышала исходное значение в 1,66–1,96 раза, отражая интенсификацию процессов синтеза Hb и изменение размеров эритроцитов (табл. 1).

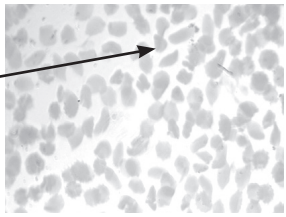
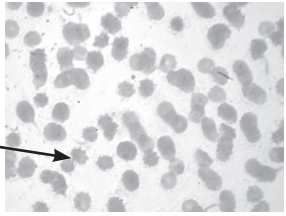
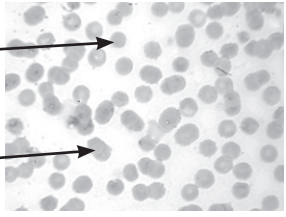
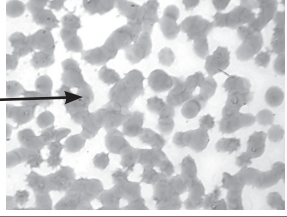

В крови мышей II гр. размер эритроцитов превышал доинтоксикационный уровень в 1,67–1,92 раза, независимо от длительности токсикоза, свидетельствуя о снижении кислородной ёмкости крови. Менее значительно токсикоз влиял на дыхательную функцию крови мышей III гр., так как величина МСН достоверно изменялась по сравнению с её уровнем только в начале опыта.

У особей I опытной гр. кадмиевая интоксикация сопровождалась появлением патологических форм

эритроцитов (табл. 2). Уже через сутки после начала токсикоза был отмечен пойкилоцитоз. При этом преобладали серповидные (20–25%), гантелевидные (10–15%) и колбовидные (5–10%) клетки. На 3-и сут. наряду с пойкилоцитозом в мазках крови появлялись акантоциты, макро- и мегалоциты, монетные столбики. Через 7 сут. токсикоза патология эритроцитов проявлялась в виде пойкилоцитоза, акантоцитов и макроцитов, а через 15 сут. – пойкилоцитоза и макроцитов. Минимальное количество патологически изменённых эритроцитов (40%) в мазках крови зафиксировано через сутки от начала токсикоза, а самое высокое – через 3 сут. (100%). При этом чаще встречались особи с двумя и более типами патологии эритроцитов (80%). Начиная с 8-х сут. кадмиевой интоксикации появлялись мазки, в которых не было установлено наличие патологически изменённых эритроцитов. Аналогичные данные получены при исследовании крови жителей Республики Алтай [3].

Появление патологических форм эритроцитов в кровяном русле, возможно, связано со способностью кадмия изменять клеточные мембраны эритроцитов за счёт снижения их антиоксидантных свойств [5]. При этом металл связывается с

2. Виды патологии эритроцитов в I опытной группе

Вид патологии	Пример мазка крови	Частота встречаемости в мазках крови (%) в ходе интоксикации (сут.)			
		1	3	7	15
Пойкилоцитоз		35–50	5–10	10–15	10–15
Акантоцит		–	10–12	8–10	–
Макроцит		–	10–15	10–12	15–20
Мегалоцит		–	3–5	–	–
Монетные столбики		–	5	–	–

отрицательно заряженными группами мембран, модифицирует заряд на их поверхности, что приводит к изменению микровязкости мембраны [6]. Ранее установлено, что Cd влияет на структуру клеток за счёт действия на процессы биосинтеза ДНК [7]. Металл ингибирует синтез белков, уменьшая биосинтез т-РНК и повреждая нуклеиновые кислоты, что нарушает механизмы репарации клеток. Появление патологических форм может являться и результатом изменений конформационной структуры молекул Hb, так как кадмий проявляет сродство к этой молекуле, что может повлиять на фенотип эритроцита [3].

При исследовании мазков крови у животных II и III гр. патологических форм эритроцитов не было выявлено.

Можно предположить, что в крови особей II гр.  $\alpha$ -токоферола ацетат повышал антиоксидантную устойчивость клеточных мембран органелл и клеток организма мышей к действию Cd, за счёт чего снижалась лабильная способность металла и степень его непосредственного воздействия на структуру эритроцитов и Hb. В пользу этого предположения свидетельствует тот факт, что витамин E способен улавливать свободные супероксидные радикалы в липидной фазе. При этом антиоксидантное действие  $\alpha$ -токоферола сохраняется при высоких концентрациях кислорода [1]. Поэтому неудивительно, что он накапливался в богатых липидами областях, контактирующих со средой с высоким парциальным давлением кислорода, – в мембранах эритроцитов.

Наши результаты не противоречат ранее полученным данным, согласно которым введение  $\alpha$ -токоферола ацетата в организм отравленных кадмием крыс приводило к уменьшению его содержания в органах животных и было связано с тем, что витамин оказывал стабилизирующее действие на мембраны клеток [2]. При этом он накапливался в них за счёт взаимодействия с альдегидами, формируя «молекулярные резервы», мобилизуемые при поступлении токсиканта, с последующим высвобождением составляющих компонентов для дальнейшей утилизации метаболитов специализированными системами детоксикации с возвращением в обращение  $\alpha$ -токоферола.

У мышей III опытной гр. отсутствие патологических форм эритроцитов может являться результатом антогонизма наночастиц серебра и кадмия. Серебро и кадмий – металлы, проникающие в кровь в составе комплексов с белком-переносчиком [8, 9]. Исходя из того что размер частиц серебра меньше, чем Cd, он более активно связывается с транспортными белками, что ингибирует всасывание кадмия. Поэтому Cd оказывал наименьшее действие на дыхательную функцию крови, минимально влиял не только на концентрацию, но и конформационную структуру молекул гемоглобина и, как

следствие, фенотип эритроцита [10]. При этом серебро активировало процессы эритропоэза, что обеспечивало повышение уровня эритроцитов в кровотоке мышей.

**Вывод.** Результаты исследований показали, что сульфат кадмия, поступающий в организм мышей per os в дозе 616,5 мг/кг, обуславливал смертность особей в группе на уровне 16,7%, снижение уровня эритроцитов с появлением аномальных форм и кислородной ёмкости крови, несмотря на увеличение концентрации гемоглобина. Сочетание кадмиевой интоксикации с введением  $\alpha$ -токоферола ацетата сопровождалось 3,3-процентной смертностью особей в группе, повышением устойчивости эритроцитов к прямому воздействию кадмия при сохранении его опосредованного влияния, проявляющегося в виде анемии, увеличения объёма эритроцитов и концентрации гемоглобина, но отсутствием патологических форм эритроцитов. Комбинирование воздействия на организм мышей сульфата кадмия и наночастиц серебра инициировало 100-процентную выживаемость особей в группе, повышение устойчивости эритроцитов к прямому и опосредованному действию кадмия, что сохраняло кислородную ёмкость крови и состояние клеточной мембраны эритроцитов. Наночастицы серебра по сравнению с  $\alpha$ -токоферолом более существенно снижали токсическое действие кадмия на клетки крови в организме мышей, проявляя значительные антиоксидантные свойства.

### Литература

1. Бокова Т.И. Экологические основы инновационного совершенствования пищевых продуктов: монография. Новосибирск: НГАУ, 2011. 284 с.
2. Мельничук Д.А., Мельникова Н.Н., Деркач Е.А. Влияние различных условий антиоксидантной защиты на кумуляции кадмия и биохимическую характеристику крови белых крыс // Современные проблемы токсикологии. 2004. № 4. С. 9–11.
3. Ильинских Н.Н. Роль высокого содержания кадмия в природной среде в патологических изменениях эритроцитов крови жителей Республики Алтай // Известия Томского политехнического университета. 2010. Т. 317. № 1. С. 184–188.
4. Тугарев А.А. Влияние кадмия на морфофункциональные характеристики эритроцитов: автореф. дисс. ... канд. биол. наук. М., 2003. 22 с.
5. Эрстенюк А.М. Биохимические механизмы повреждения эритроцитов при экспериментальной интоксикации кадмием: автореф. дисс. ... докт. биол. наук. Киев: Национальный МУ им. О.О. Богомольца, 2004. 36 с.
6. Рыспекова Н.Н., Нурмухамбетов А.Н., Аскарлова А.Е. Роль тяжёлых металлов в развитии анемий (обзор литературы) [Электронный ресурс]. URL: <http://kaznmu.kz/press/2013/05/23/> (дата обращения 03.11.2013).
7. Дерхо М.А., Серета Т.И., Рыбьянова Ж.С. Прямое и опосредованное действие кадмия на лейкоциты крови мышей // Научный взгляд на современное общество: сб. статей междунар. науч.-практич. конф. Уфа: РИО МЦИИ ОМЕГА СКИНС, 2014. С. 6–9.
8. Шамсутдинова И.Р., Дерхо М.А. Изменения морфологических показателей крови лабораторных животных при введении наночастиц серебра per os // АПК России. 2015. Т. 73. С. 166–170.
9. Шамсутдинова И.Р., Дерхо М.А. Оценка действия биодоз наночастиц серебра на обмен белков в организме животных // Инновационная наука. 2015. № 10-3. С. 17–20.
10. Омарова А.С. К особенностям реакции позвоночных на CdCl<sub>2</sub> // Актуальные проблемы экологии, посвящ. Году здоровья и 30-летию Каргу им. Е.А. Букетова: матер. науч.-практич. конф. Караганда, 2002. С. 269–271.