

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.
ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики

**ОТДЕЛЬНОЕ И СОЧЕТАННОЕ ДЕЙСТВИЕ ХИМИЧЕСКИХ
ТОКСИКАНТОВ И СВЕТОВОГО СТРЕССА НА
АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ
ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4-го курса 421 группы
направления 06.03.01 – Биология
биологического факультета
Фирсовой Екатерины Владимировны

Научный руководитель:
профессор кафедры биохимии и биофизики,
д.б.н., доцент _____ Е.В. Плешакова

Заведующий кафедрой биохимии
и биофизики, д.б.н., профессор _____ С.А. Коннова

Саратов 2016 год

Введение. На здоровье людей ежедневно оказывают воздействие нитраты и нитриты, попадая в организм через воду и по пищевой цепи. Нитриты находятся практически во всех продуктах питания, т.к. они часто используются как консерванты, главным образом, в мясных продуктах – ветчине, колбасе и т.д. Нитраты сами по себе не обладают выраженной токсичностью, однако однократный прием 1-4 г нитратов вызывает у людей острое отравление, а доза 8-14 г может оказаться смертельной. Нитраты и нитриты при продолжительном воздействии на эпителий желудка могут вызывать его перерождение. Отравление нитратами опасно еще и тем, что восстанавливающиеся из них нитриты соединяются с аминами и амидами любых доброкачественных белковых продуктов и образуют канцерогенные соединения нитрозамины [1]. Нитрозамины могут вызывать образование опухолей печени, почек, желудка, пищевода, легких, мочевого пузыря, трахеи, гортани, носовой полости и др. [2, 3].

Известно, что активность некоторых ферментов в сыворотке крови резко возрастает при некоторых патологических состояниях [4]. Изучение активности аминотрансфераз в сыворотке крови имеет большую диагностическую ценность. При этом повышение активности аспартатаминотрансферазы (АСТ) указывает на преимущественное поражение сердца, а аланинаминотрансферазы (АЛТ) – печени [5, 6]. Определение активности гамма-глутамилтрансферазы (ГГТ) в сыворотке крови является диагностическим критерием состояния печени и желчных путей [7]. Доказано, что ГГТ является клеточно-биохимическим маркером устойчивости к стрессу различного происхождения [8].

Потенциальная опасность воздействия химических токсикантов, в том числе, нитратов и нитритов, на здоровье людей усиливается факторами, проявляющимися в условиях современного города: стресс, витаминная недостаточность, нарушения светового режима и др.

Целью настоящей работы явилось исследование активности индикаторных ферментов в сыворотке крови лабораторных мышей при

энтеральном введении нитрита, амина и их комбинации в отсутствии и присутствии светового стресса.

Были поставлены следующие задачи:

1. Определить активность АЛТ в сыворотке крови лабораторных мышей при энтеральном введении нитрита, амина и их комбинации в отсутствии и присутствии светового стресса.
2. Оценить активность АСТ в сыворотке крови лабораторных мышей при энтеральном введении нитрита, амина и их комбинации в отсутствии и присутствии светового стресса.
3. Определить активность ГГТ в сыворотке крови лабораторных мышей при энтеральном введении нитрита, амина и их комбинации в отсутствии и присутствии светового стресса.
4. На основании изученных показателей установить особенности действия химического, физического стресса и их сочетания на организм экспериментальных животных.

В экспериментах использовали 60 белых беспородных мышей (самцы и самки) возрастом 2 месяца и весом около 20 г. Эксперименты на животных проводились в соответствии с требованиями Женевской конвенции «International Guiding Principles for Biomedical Involving Animals» (Geneva, 1990). Химический стресс моделировали ежедневным энтеральным введением 0,2% раствора NaNO_2 в питьевой воде, *p*-толуидина (2 г/кг корма) по отдельности или в комбинации (таблица 1); физический стресс – круглосуточным освещением (800 люкс). Продолжительность всего эксперимента составляла 107 сут., промежуточный анализ был произведен спустя 79 сут. Определение активности ферментов (АЛТ, АСТ и ГГТ) проводили в сыворотке крови животных с помощью полуавтоматического биохимического анализатора «CLIMA MC-15» с использованием стандартных наборов реактивов производства ЗАО «Диакон-ДС».

Бакалаврская работа состоит из введения, 3 глав (обзор литературы, материал и методы, результаты исследования), заключения, выводов, списка использованных источников, включающего 56 источников.

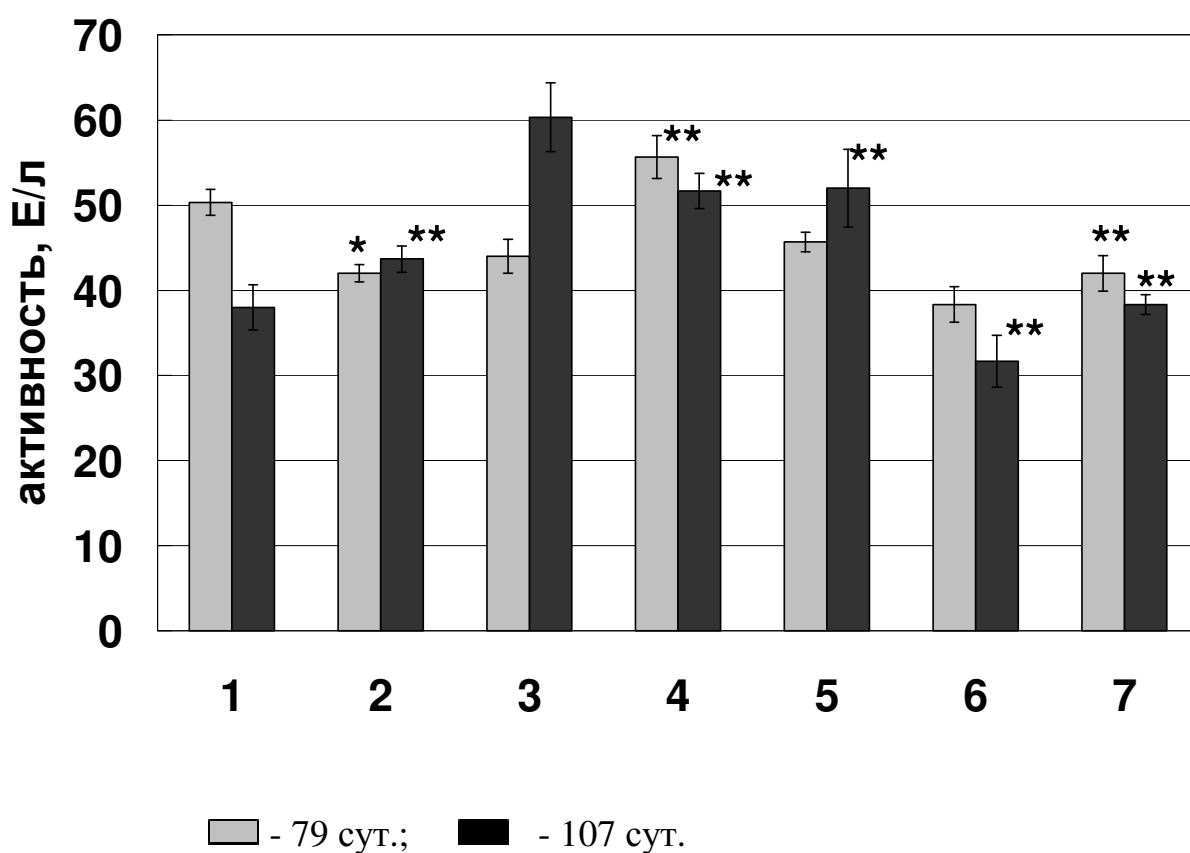
Основное содержание работы. Нами исследовалось отдельное и сочетанное воздействие на лабораторных мышей нитрита натрия и амина (на примере *p*-толуидина) в условиях дополнительного светового стресса и без него.

Таблица 1 – Условия проведения эксперимента по оценке влияния химического и физического стресса на активность ферментов в сыворотке крови лабораторных мышей

№ группы	Пол	Количество особей	Условия кормления	Условия содержания
1	♂	6	<i>Контроль</i> (стандартный рацион**)	Через 35 дней после начала эксперимента введён дополнительный стрессовый фактор – освещение.
2	♂	10	стандартный рацион** + 0,1% раствор NaNO ₂ в питьевой воде; 0,5 мкл толуидина (на 1 животное)	Через 35 дней после начала эксперимента введён дополнительный стрессовый фактор – освещение.
3	♀	6	<i>Контроль</i> (стандартный рацион**)	Через 35 дней после начала эксперимента введён дополнительный стрессовый фактор – освещение.
4	♀	10	стандартный рацион** + 0,1% раствор NaNO ₂ в питьевой воде; 0,5 мкл толуидина (на 1 животное)	Через 35 дней после начала эксперимента введён дополнительный стрессовый фактор – освещение.
5	♀	9	стандартный рацион** + 0,1% раствор NaNO ₂ в питьевой воде	Через 35 дней после начала эксперимента введён дополнительный стрессовый фактор – освещение.
6	♀	9	стандартный рацион** + 0,5 мкл толуидина (на 1 животное)	Через 35 дней после начала эксперимента введён дополнительный стрессовый фактор – освещение.
7	♀	10	<i>Контроль</i> стандартный рацион**	Стандартные условия без стрессовых факторов.

** – стандартный рацион включает в себя: ячмень, овёс сухой, овёс пророщенный, хлеб, яблоки морковь, паштет шпротный.

Было установлено, что световой стресс приводит к увеличению активности АЛТ у самок мышей через 107 сут. в 1,4 раза, тогда как через 79 сут. она не отличалась от контрольных значений (рисунок 1). У самцов, находящихся под стрессовым воздействием, активность этого фермента на 79 сут. была на 10 единиц выше, чем у самок, снижаясь к концу эксперимента. Эти данные свидетельствуют о влиянии светового стресса на активность АЛТ у экспериментальных животных, которое проявляется у самцов на более ранних сроках.



Примечание: * – показатели с уровнем достоверности более 95% по сравнению с контролем); ** – показатели с уровнем достоверности более 99% по сравнению с контролем (контролем для 2 группы является группа 1; контролем для 4, 5, 6 групп является группа 3).

Рисунок 1 – Активность АЛТ в сыворотке крови мышей.

Дополнительное введение нитрита, амина и их комбинации на фоне светового стресса оказало следующий эффект на активность АЛТ

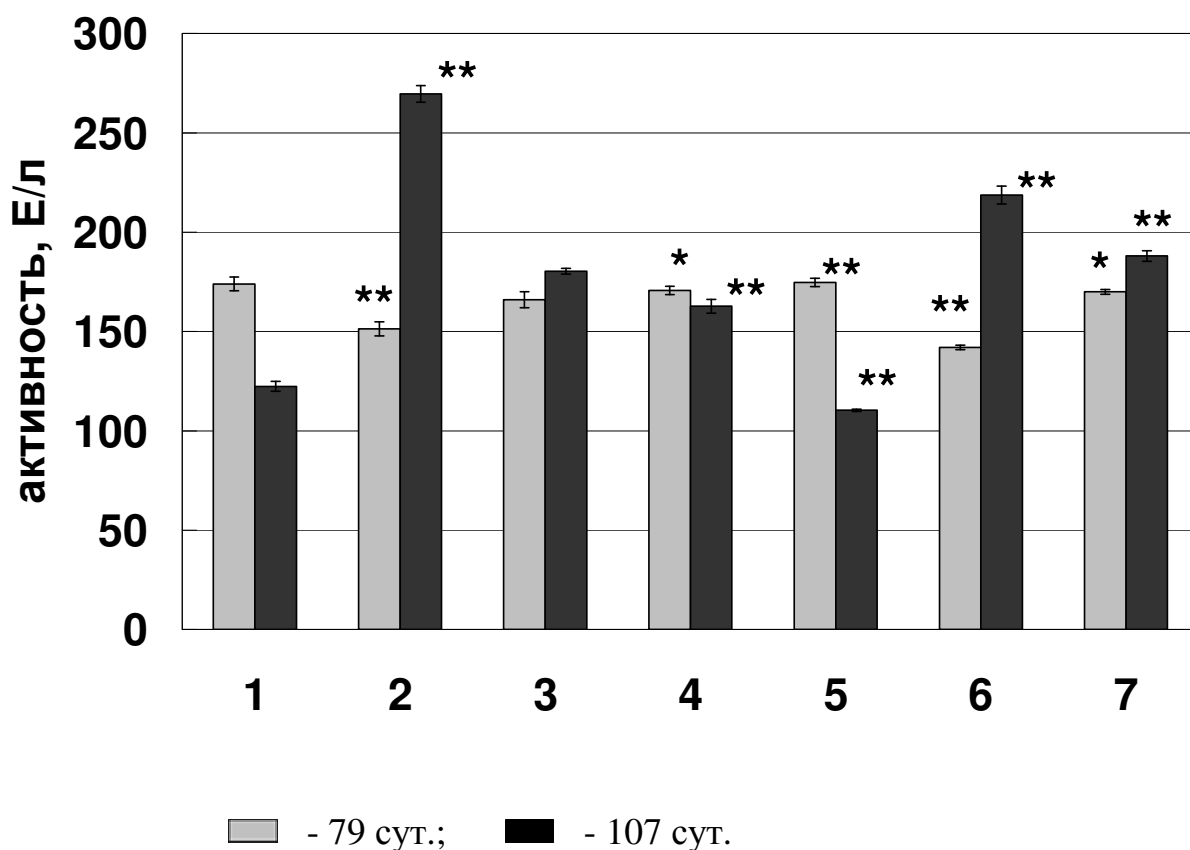
(рисунок 1). Достоверное повышение активности АЛТ через 79 сут. выявлено только у самок лабораторных мышей, получавших комбинацию нитрита и *p*-толуидина. Через 107 сут. эксперимента в группе 4 сохранялась повышенная активность фермента, также отмечалось повышение активности АЛТ у мышей, которым добавляли в пищу NO_2 .

При этом выявлено достоверное повышение по сравнению со световым контролем активности фермента во всех опытных группах мышей, за исключением животных, которым в корм вводили только *p*-толуидин. Проведенные эксперименты показали, что нитрит и его сочетание с амином повышает активность АЛТ в сыворотке крови лабораторных животных (самок), что может свидетельствовать о гепатоксическом воздействии этих веществ.

Была изучена активность АСТ в сыворотке крови контрольных мышей (самцы и самки), содержащихся как в условиях светового стресса, так и без него, через 79 сут. эксперимента находилась в диапазоне 166-188 Е/л, соответствуя нормальным показателям (рисунок 2). Через 107 сут. заметного изменения активности АСТ не обнаруживалось в этих группах животных.

Полученные данные показали, что этот вид стресса не оказал существенного влияния на изменения активности АСТ, в отличие от АЛТ. В условиях дополнительной токсической нагрузки через 79 сут. эксперимента показатели активности АСТ существенно не отличались от значений в группах без добавления в корм химических веществ (самцы и самки). Достоверное (99%) повышение активности данного фермента отмечалось в группе самок, получавших с кормом нитрит.

Через 107 сут. активность этого фермента у самцов, получавших комбинацию нитрита и амина, возросла в 1,8 раза, у самок, получавших с кормом только амин – в 1,5 раза по сравнению с предыдущим измерением (рисунок 2). По сравнению со значениями активности АСТ у мышей, подвергнутых только световому воздействию, в вышеназванных группах активность фермента была выше: у самцов – в 2,2 раза; у самок – в 1,2 раза.



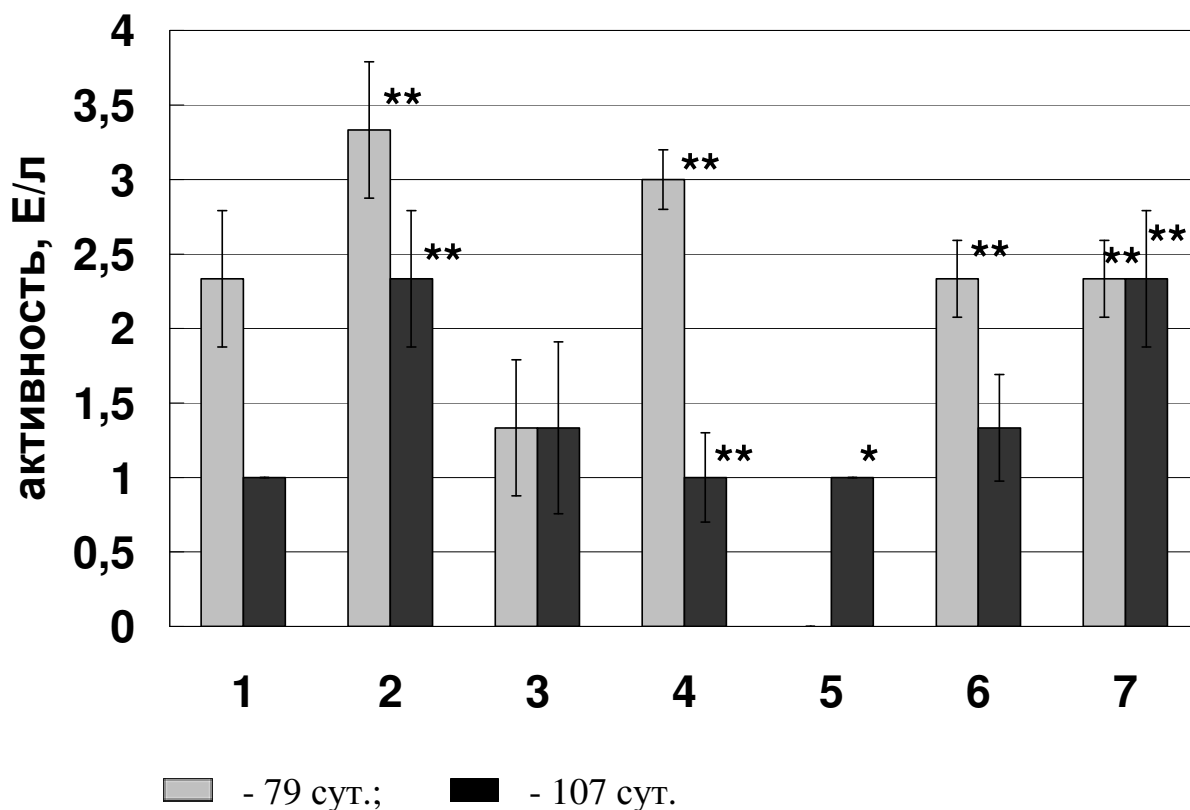
Примечание: * – показатели с уровнем достоверности более 95% по сравнению с контролем); ** – показатели с уровнем достоверности более 99% по сравнению с контролем (контролем для 2 группы является группа 1; контролем для 4, 5, 6 групп является группа 3).

Рисунок 2 – Активность АСТ в сыворотке крови мышей.

Таким образом, под воздействием нитрита и амина изменения данного показателя у лабораторных животных наблюдалось как у самцов, так и самок, эти изменения проявляются при более длительном воздействии токсикантов и могут свидетельствовать о токсическом поражении печени и сердца.

В ходе настоящих экспериментов обнаружено, что через 79 сут. эксперимента активность ГГТ в сыворотке крови контрольной группы мышей (самок), которые содержались в нормальных условиях, составляла около 2 Е/л (рисунок 3). Аналогичные значения наблюдались у самцов, находящихся под световым стрессовым воздействием. У самок,

подвергнутых воздействию света, этот показатель был примерно в 2 раза ниже и сохранялся в течение всего эксперимента.



Примечание: * – показатели с уровнем достоверности более 95% по сравнению с контролем); ** – показатели с уровнем достоверности более 99% по сравнению с контролем (контролем для 2 группы является группа 1; контролем для 4, 5, 6 групп является группа 3).

Рисунок 3 – Активность ГГТ в сыворотке крови мышей.

Через 107 сут. активность ГГТ уменьшилась в 2 раза и в группе самцов, находящихся в условиях светового стресса. Таким образом, влияние светового стресса на активность ГГТ у экспериментальных животных проявляется у самок на более ранних сроках.

Сочетанное действие нитрита и амина на фоне светового стресса привело в группах самцов и самок к достоверному увеличению активности фермента на 79-е сут. (рисунок 3). У самок, получавших с кормом *p*-толуидин, активность ГГТ была повышена по сравнению с группой 3

(световой стресс), но была сравнима с активностью у контрольной группы. Через 107 сут. активность данного фермента уменьшилась в группах с химическими реагентами и была на уровне контрольных значений или в 2 раза ниже. В группе самок, получавших с кормом нитрит, на протяжении эксперимента обнаруживались минимальные значения активности ГГТ в сыворотке крови мышей.

Обнаруженные нами в ходе эксперимента колебания значений активности ГГТ при совместном действии светового и химического стресса могут указывать на неспецифический характер этой реакции. Можно отметить также половые различия при изменении активности этого фермента под влиянием стрессоров.

Заключение. В настоящем исследовании установлено, что химическое воздействие в сочетании со световым приводит к увеличению активности аминотрансфераз (АЛТ и АСТ) в сыворотке крови, которое отражает состояние клеточных мембран. Полученные результаты демонстрируют гепатотоксическое действие комбинации стрессовых факторов, а также вероятное возрастание проницаемости мембран не только клеток печени, но и сердечной мышцы. Причем при более длительной экспозиции возможно усиление кардиотоксического действия.

В ходе проведенных экспериментов выявлено, что световой стресс вызывает повышение активности АЛТ у экспериментальных животных, которое проявляется у самцов при более короткой продолжительности воздействия. Это может свидетельствовать о повреждении мембран клеток печени в этих условиях. Обнаруженное нами снижение активности ГГТ под действием светового стресса, которое проявляется у самок на более ранних сроках, может указывать на изменение синтеза белка.

Также обнаружено, что изменения активности сывороточной ГГТ носит неспецифичный характер. В ходе эксперимента комбинированное действие стрессоров различной природы способствует изменению

активности сывороточной ГГТ по сравнению с контрольными группами, как в сторону повышения, так и в сторону понижения данного показателя.

В ходе исследования установлено, что сочетанное воздействие химического и физического стресса оказывает широкое негативное воздействие на организм лабораторных животных.

Выводы:

1) Показано, что нитрит и его сочетание с амином повышает активность АЛТ в сыворотке крови лабораторных животных (самок).

2) Установлено, что энтеральное введение нитрита и амина увеличивает активность АСТ в сыворотке крови самцов и самок лабораторных животных, изменения данного показателя обнаруживаются при более длительном воздействии токсикантов.

3) Показано, что световой стресс увеличивает активность АЛТ в сыворотке крови мышей, эти изменения обнаруживаются у самцов при более короткой продолжительности воздействия; не влияет на активность АСТ и снижает активность ГГТ в сыворотке крови экспериментальных животных, что выявляется у самок при более короткой продолжительности воздействия.

4) Обнаружено, что изменение активности ГГТ в сыворотке крови лабораторных животных при действии стрессоров различной природы носит неспецифичный характер и зависит от пола животных.

Список использованных источников

1. Профилактика загрязнения пищевых продуктов канцерогенными веществами / Б. Л. Рубенчик [и др.]. Киев: Здоровье. 1983. 160 с.

2. Mensinga, T. T. Health implications of exposure to environmental nitrogenous compounds / T. T. Mensinga, G. J. Speijers., J. Meulenbelt // Toxicol. Rev. 2003. Vol. 22, № 1. P. 41-51.

3. Нитраты, нитриты и N-нитрозосоединения / Совместное издание программы ООН по окружающей среде и Всемирной

организации здравоохранения. Женева: Всемирная организация здравоохранения, 1981. 118 с.

4. Медицинская энзимология: учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / Е. Г. Инешина [и др.]; под ред. А. А. Анисимова. Горький, 1978. 98 с.

5. Пурсанов, К. А. Модификация гепарином активности аминотрансфераз при действии пчелиного яда и этанола / К. А. Пурсанов, З. В. Перепелюк // Заоч. науч.-практ. конф. [Электронный ресурс]. URL: <http://sibac.info/index.php>. (дата доступа: 12.01.2012).

6. Шерлок, Ш. Заболевания печени и желчных путей / Ш. Шерлок, Дж. Дули. М.: ГЕОТАР Медицина, 1999. 864 с.

7. Назаренко, Г. И. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований / Г. И. Назаренко, А. А. Кишкун. М.: Медицина, 2002. 544 с.

8. Koner, B. C. Effects of stress on gamma glutamyltranspeptidase (GGT) activity in lymphoid system of rats: modulation by drugs / B. D. Banerjee, A. Ray // Indian J Exp. Biol. 1997. Vol. 35, № 3. P. 222-224.