

УДК 577.17:615:619:612.015

МОРФОБИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ И АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ОБМЕНА УГЛЕВОДОВ В ТКАНЯХ КОРОВ ПРИ АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКЕ

*Василий БУЦЯК, Анна БУЦЯК**Львовский национальный университет ветеринарной медицины и биотехнологии имени С.З.Гжицкого, г. Львов, Украина*

Abstract. The aim of our research was to study the dynamics of blood morphological and biochemical characteristics, as well as the activity of carbohydrate metabolism enzymes in the tissues of cows that are exploited in a biogeochemical area with elevated concentrations of heavy metals in water and feeds, on the background of the use of zeolite as a feed additive. The findings from this study demonstrate that heavy metals, which penetrate into the body of cows with the feeds, affect the enzyme activity of different animal organs differently. The enzymes located in the liver are inhibited most, and those located in the skeletal muscles are inhibited least. The use of zeolite flour as a feed additive for 180 days had a positive effect on blood haematological parameters and carbohydrate metabolism in the organs of cows, as manifested by the recovery of the activity of certain carbohydrate metabolism enzymes. Thus, lactate dehydrogenase activity was recovered most of all with the total percentage of 50.0% (liver - 28.6%, heart muscle - 12.5% and skeletal muscle - 8.9%).

Key words: Cows; Heavy metals; Zeolite; Blood; Enzyme activity; Carbohydrate metabolism

Реферат. Целью наших исследований было изучить динамику морфобиохимических показателей крови и активность ферментов обмена углеводов в тканях коров, которые эксплуатируются в биогеохимической зоне с повышенным содержанием тяжелых металлов в воде и кормовом рационе, на фоне использования цеолита как кормовой добавки. Исследованиями установлено, что тяжелые металлы, которые с кормами поступают в организм коров, неодинаково влияют на активности изучаемых ферментов различных органов животных. Более всего ингибируются ферменты, локализованные в печени, а наименьшее - в скелетных мышцах. Скармливание цеолитовой муки в качестве кормовой добавки в течение 180 дней благоприятно влияло на гематологические показатели крови и на метаболизм углеводов в органах коров, что проявлялось в восстановлении активности отдельных ферментов углеводного обмена. Так, более всего восстанавливалась активность лактатдегидрогеназы с суммарным процентом 50,0% (печень - 28,6%; сердечная мышца - 12,5% и скелетная мышца - 8,9%).

Ключевые слова: Коровы; Тяжелые металлы; Цеолит; Кровь; Ферментная активность; Углеводный обмен

ВВЕДЕНИЕ

Современное состояние сельскохозяйственного производства находится в условиях роста техногенной нагрузки на окружающую среду.

Антропогенная деятельность сопровождается рассеиванием значительного количества химических элементов, вовлеченных в миграционные процессы. Особая роль среди них принадлежит тяжелым металлам, которые являются высокотоксичными и могут влиять на живые организмы даже в малых концентрациях (Владимцева, Т.М, Успенская, Ю.А. 2002). Тяжелые металлы не только снижают биологическую ценность кормов, но и приводят к постепенному накоплению токсикантов в тканях организма животных, что является причиной острых и хронических интоксикаций (Трахтенбер, И.М. 1997).

Продуктивные качества животных определяются генетической обусловленностью интенсивности обмена веществ, и в первую очередь, углеводов. Пути обмена углеводов разнообразны, что ставит их на центральное место среди быстро метаболизирующих веществ (Макух, С.М., Буцяк, В.І. 2002).

Изучение особенностей биологии животных, их требования к внешней среде, позволяет создать "биологический комфорт" организма как предпосылку для реализации потенциальных возможностей животных, для получения высокой и качественной продукции в локальных зонах техногенной нагрузки (Кравців, Р.Й., Буцяк, В.І. 2003).

Закономерности, определяющие поведение тяжелых металлов в окружающей среде и организме животных, является одной из актуальных проблем. Целью наших исследований было изучить динамику морфобиохимических показателей крови и активность ферментов обмена углеводов в тканях коров, которые эксплуатируются в локальной зоне с повышенным содержанием тяжелых металлов, на фоне использования в рационе цеолита как кормовой добавки.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Экспериментальные исследования проведены на дойных коровах украинской черно-пестрой молочной породы. Контролем были животные, которые эксплуатировались в условиях экологически чистой зоны.

Опытные группы (по 5 голов) это животные, завезенные из Николаевского района Львовской обл. (уровень кадмия, плумбума, ртути и цинка в кормовом рационе и воде превышал максимально предельный уровень МПУ).

Уравнительный период длился 60 дней а исследовательский - 180 дней. Рационы были одинаковыми по набору кормов и питательности. Второй опытной группе, дополнительно к основному рациону скармливали цеолитовую муку в дозе 30 г на 1 к. ед.

Кровь забирали в стеклянные пробирки с раствором гепарина в качестве антикоагулянта. Эритроциты получали путем центрифугирования цельной крови 15 мин при 700 g, а сыворотку - после ее отстаивания в 1 год при 37°C с последующим центрифугированием.

Гематологические исследования проводили по общепринятым методикам, содержание гемоглобина определяли гемоглобинцианидным методом (Меньшиков, В.В. 1988). В эритроцитах исследовали АТФ-азную активность по приросту неорганического фосфата. В сыворотке крови исследовали активность церулоплазмينا – по методу Houskin, модифицированного Миттельштейном, щелочной фосфатазы – методом Боднского и кальция – комплексометрическим методом. Концентрацию неорганического фосфата исследовали методом Фиске и Суббарова с использованием аскорбиновой кислоты как восстановителя.

Образцы тканей печени, сердечной и скелетной мышц брали после забоя животных. Для получения гомогенатов, ткани органов растирали на холоде с добавлением охлажденного 0,05 М трис-НСl буфера, рН-7,4 в соотношении 1:9 (масса/объем).

Экстракты тканей получали центрифугированием гомогенатов при 850 g 5 мин. В экстрактах тканей определяли активность ферментов гликолиза: глюкозофосфатизомеразы (ГФИ); лактатдегидрогеназы (ЛДГ); альдолазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ) - фермента пентозофосфатного пути (Захарин, Ю.Л. 1967). Полученные результаты обрабатывали методами вариационной статистики с использованием t-критерия достоверности Стьюдента (Кокунин, В.А. 1975).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Предыдущими исследованиями нами было установлено высокое содержание, в кормовом рационе исследовательских коров, подвижных форм Кадмия, Плумбума, Ртути и Цинка, которое превышало МПУ. При таких условиях установлено, что концентрация эритроцитов в первой опытной группе коров равна 4,86 Т/л и была на 21,7% ниже контрольных показателей. Закономерно, что количество гемоглобина снизилось на 25,0% и составляла 76,8 г/л (оба показателя были ниже физиологических норм), уровень лейкоцитов, наоборот, в 1,76 раза превышал контроль и составил 11,9 Г/л, что соответствует верхней границе физиологической нормы (4,5-12,0 Г/л), проявляя незначительный лейкоцитоз (Табл. 1).

Таблица 1. Показатели гематологических и биохимических исследований ($M \pm m$, $n = 5$)

Показатели и единицы измерения	Контроль	I опытная	II опытная
Количество эритроцитов, Т/л	6,20 ± 0,24	4,86 ± 0,22*	5,68 ± 0,24*
Количество гемоглобина, г/л	102,4 ± 4,82	76,8 ± 3,86*	90,6 ± 4,12*
Количество лейкоцитов, Г/л	6,80 ± 0,22	11,98 ± 0,54*	9,68 ± 0,44*
АТФ-аза, мкмоль/мл/мин.	0,063 ± 0,005	0,041 ± 0,003	0,056 ± 0,003*
Церулоплазмин, мкмоль/л	0,810 ± 0,07	0,680 ± 0,03*	0,770 ± 0,04*
Щелочная фосфатаза, Ед. Боданского	3,14 ± 0,19	1,98 ± 0,11*	2,64 ± 0,15*
Са, ммоль/л	2,76 ± 0,14	2,14 ± 0,12*	2,52 ± 0,14*
Р, ммоль/л	1,48 ± 0,05	1,78 ± 0,10*	1,56 ± 0,08*
Отношение Са/Р	1,86	1,20	1,61

Примечание. * - в таблицах Р d' 0,05.

Известно, что эффективность эритропоэза, при хронической интоксикации тяжелыми металлами, снижается, тормозятся ферментные системы, которые обеспечивают синтез предшественника гема и эритроцитов в костном мозге. Тяжелые металлы обладают способностью разрушать эритроциты. Установлено, что в процессе кадмиевой интоксикации наблюдаются существенные изменения в системе гемоглобина, а именно достоверно снижается уровень сульфгемоглобина и метгемоглобина на фоне снижения уровня общего гемоглобина (Губский, Ю.И., Ерстенюк, Г.М. 2002). Наряду с этим, активность церулоплазмينا (в состав которого входит около 80% меди организма) снизилась на 16,1%.

Церулоплазмин и медь стимулируют синтез гемоглобина и эритропоэз. Все это приводит к уменьшению количества эритроцитов и гемоглобина в крови первой опытной группы коров. Активность АТФ-азы в эритроцитах первой опытной группы коров, которые потребляли корма с повышенным содержанием тяжелых металлов, снизилась на 34,9%, вероятно, это связано с изменениями концентраций ионов Mg^{2+} и Ca^{2+} , которые являются активаторами данного фермента.

Снижение активности щелочной фосфатазы на 47,0%, под влиянием тяжелых металлов, указывает на нарушение процессов энергетического обеспечения (расщепление АТФ), которое связано с торможением АТФ-азы. Однако, при таких условиях, повышение уровня неорганического фосфора на 20,2% может происходить за счет угнетения процессов фосфоролиза, а также способности отдельных тяжелых металлов (Плюмбама) активировать кислую фосфатазу.

Содержание общего кальция в сыворотке первой опытной группы на 22,5% было ниже показателей контрольной группы, а его количество (2,14 ммоль) было ниже показателей физиологической нормы. По данным литературы известно, что механизм развития свинцовой интоксикации непосредственно связан с нарушениями гомеостаза кальция. Следует отметить, что в I опытной группе наблюдалось снижение кальций-фосфатного соотношения до 1,20, тогда как оптимальное соотношение – 1,51-2,08.

Коррекция кормового рациона второй опытной группы коров цеолитовой мукой в дозе 30 г на 1 к. ед, предотвращало развитие хронической интоксикации тяжелыми металлами организма животных. Так, уровень эритроцитов и гемоглобина увеличились на 16,9 и 17,9%, а их количество (5,68 т/л и 90,6 г/л) было в пределах физиологической нормы, с одновременным уменьшением уровня лейкоцитов на 23,7% по сравнению с первой исследовательской группой.

Активности АТФ-азы, церулоплазмينا и щелочной фосфатазы были выше на 36,6; 13,2 и 33,3% от показателей первой опытной группы. Содержание кальция составляло 2,52 ммоль и было выше на 17,7% от показателей опытной группы, а уровень неорганического фосфора 1,56 ммоль, что соответственно ниже на 14,1 от показателей первой опытной группы. Кальций-фосфатное соотношение (1,61) соответствовало оптимальной физиологической нормы.

Исследование активности ферментов в органах коров, которые были завезены из биогеохимической провинции с повышенным содержанием тяжелых металлов в воде и кормовом рационе, показали (Табл. 2), что техногенный фактор значительно подавляет активности ферментов углеводного обмена.

Более всего подавляются ферменты печени (ЛДГ на 33,4%; ГФИ на 6,9%; Г-6-ФДГ на 21,3% и альдолаза на 13,3%) и сердечной мышцы (ЛДГ на 23,5%; ГФИ на 21,0%; Г-6-ФДГ на 17,7% и альдолаза на 4,0%), наименьше – скелетной мышцы (ЛДГ на 19,6%; альдолаза на 9,6%; Г-6-ФДГ на 6,7% и ГФИ на 5,8%). Если ингибирование исследуемых ферментов в скелетной мышце брать за 1,0, то в сердечной мышце оно равно 1,58, а в печени - 2,27.

В скелетной мышце активность ферментов гликолиза (ГФИ, альдолазы и ЛДГ) ниже в 2,7; 1,9 и 4,0 раза по сравнению с соответствующими ферментами мышечной ткани, однако они были выше на 68,3; 9,4 и 6,3% чем активность данных ферментов печени.

По результатам наших исследований, наиболее ингибируется ЛДГ с условно суммарным процентом 76,5%; ГФИ - 53,7%; Г-6-ФДГ - 45,7% и альдолаза - 26,9%. Таким образом, тяжелые металлы не одинаково влияют на активность ферментов превращения углеводов в различных органах, что обусловлено определенными функциональными особенностями последних.

Скармливание цеолитовой муки в качестве кормовой добавки в течение 180 дней благоприятно влияло на метаболизм углеводов в органах коров, что проявлялось в повышенной активности исследуемых ферментов. Так, более всего восстанавливалась активность ЛДГ с суммарным

Таблица 2. Влияние тяжелых металлов на активность ферментов обмена углеводов ($M \pm m, n = 3$).

Ткани	Ферменты			
	ГФИ,	Альдолаза	ЛДГ	Г-6-ФДГ
Контрольная группа				
Печень	0,41 ± 0,02	0,415 ± 0,02	0,060 ± 0,005	0,33 ± 0,03
Сердечная мышца	1,29 ± 0,09	0,458 ± 0,018	0,064 ± 0,006	0,17 ± 0,02
Скелетная мышца	3,48 ± 0,21	0,862 ± 0,04	0,256 ± 0,02	0,03 ± 0,003
I опытная группа				
Печень	0,30 ± 0,015*	0,36 ± 0,019*	0,04 ± 0,004	0,26 ± 0,02
Сердечная мышца	1,02 ± 0,07	0,44 ± 0,021*	0,049 ± 0,003*	0,14 ± 0,01
Скелетная мышца	3,28 ± 0,19*	0,78 ± 0,04*	0,206 ± 0,01*	0,028 ± 0,001*
II опытная группа				
Печень	0,38 ± 0,02*	0,39 ± 0,02*	0,052 ± 0,003*	0,31 ± 0,02
Сердечная мышца	1,10 ± 0,16*	0,43 ± 0,018*	0,056 ± 0,003*	0,15 ± 0,01
Скелетная мышца	3,30 ± 0,18*	0,84 ± 0,04*	0,226 ± 0,01*	0,029 ± 0,002*

процентом 50,0% (печень - 28,6%; сердечная мышца - 12,5% и скелетная мышца - 8,9%). Суммарное восстановление активности ГФИ и Г-6-ФДГ соответственно равна 29,1 и 26,4% (печень - 21,1 и 16,2%; сердечная мышца - 7,3 и 6,7% и скелетная мышца - 0,7 и 3,5%).

Меньше всего восстанавливалась активность альдолазы (12,6%) в печени и скелетных мышцах, соответственно на 7,7 и 7,2%, а в сердечной мышце активность альдолазы подавлялась на 2,3%. Если восстановление активности в скелетной мышце взять за 1,0, то в сердечной мышце она будет 1,19, а в печени - 3,63. Следовательно, в условиях экспериментальных исследований, скармливание коровам цеолита, более чем в три раза повышает активность исследуемых ферментов в печени по сравнению с сердечной и мышечной тканями.

ВЫВОДЫ

Исследованиями установлено, что тяжелые металлы, которые с кормами поступают в организм коров, неодинаково влияют на активность изучаемых ферментов различных органов животных. Более всего ингибируются ферменты, локализованные в печени, а наименьше - в скелетных мышцах.

Использование цеолитовой муки мелкого помола Сокирницкого месторождения в дозе 30 г на 1 к. ед как минеральной добавки к рациону с повышенным содержанием тяжелых металлов, благоприятно влияет на гематологические показатели крови, восстанавливает активность отдельных ферментов углеводного обмена в тканях коров, а также активизирует процессы энергетического, пластического и минерального обмена.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. ВЛАДИМЦЕВА, Т.М., УСПЕНСКАЯ, Ю.А., НЕФЕТОВА, В.В. и др., 2002. Мутагенез, индукция клеточной гибели и окислительного стресса при цинковой интоксикации. В: Гигиена и санитария, № 4, с. 56-57.
2. ГУБСЬКИЙ, Ю.І., ЕРСТЕНЮК, Г.М., 2002. Вплив важких металлів на активність ферментів за дієвості інтоксикації. В: Укр. біохімічний журнал, т. 74, № 5, с. 124-127.
3. ЗАХАРІН, Ю.Л., 1967. Метод определения глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы. В: Лабораторное дело, № 6, с. 327-330.
4. КРАВЦІВ, Р.І., БУЦЯК, В.І., 2003. Вплив важких металлів на метаболізм вуглеводів та активності ферментів у крові корів. В: Вісник аграрної науки, № 2, с. 43-46.
5. КОКУНИН, В.А., 1975. Статистическая обработка при малом количестве опытов. В: Укр. биохим. журн., т. 47, № 6, с. 776-791.
6. МАКУХ, Є.М., БУЦЯК, В.І., 2002. Тканинні особливості скраєвих НАДФ-і НАД-залежних дегідрогеназ у корів. В: Науковий вісник ЛДАВМ, т. 4, № 1, с. 12-14.
7. ТРАХТЕНБЕРГ, И.М., 1997. Тяжёлые металлы как химические загрязнители производственной среды. В: Доклады о здоровье, № 2, с. 48-51.

Data prezentării articolului: 15.04.2013

Data acceptării articolului: 16.03.2014