

Теоретические и прикладные предпосылки эндемической иктерогемоглобинурии каракульских овец

Сафин Марс Габдулхакович
Самаркандский государственный университет
Рахмонов Фарход Холбаевич
Эшимов Дустмурат

Самаркандский институт ветеринарной медицины, (г. Самарканд, Узбекистан)

Аннотация. На основании глубокого анализа литературных данных и результатов собственных исследований делается попытка раскрыть биохимические механизмы возникновения, развития и проявления клинических признаков эндемической иктерогемоглобинурии каракульских овец выпасаемых на пастбищах Юго-Западных Кызылкумов.

Ключевые слова: эндемическая иктерогемоглобинурия, обмен меди, гепатоцит, субклеточные органеллы, ферменты, медное отравление, пирролизидиновые алкалоиды, медьсодержащие белки, металлохioneин.

Theoretical and applied premises of endemic ikterohemoglobinuria of Karakul sheep

Annotation. Based on a deep analysis of literature data and the results of our own research, an attempt is made to reveal the biochemical mechanisms of the appearance, development and manifestation of clinical signs of endemic ikterohemoglobinuria of Karakul sheep grazed on the pastures of south-western Kyzylkum.

Keywords: endemic ikterohemoglobinuria, copper metabolism, gerotocyte, subcellular organelles, enzymes, copper poisoning, pyrrolisidine alkaloids, copper-containing proteins, metallothionein.

Известно, что в Узбекистане широко распространены нарушения медного обмена каракульских овец, связанные как с недостатком, так и с избытком этого элемента в их организме [1,2,3]. Оба эти вида нарушения обмена меди сопровождаются серьезными патологическими отклонениями, приводящими к снижению продуктивности каракульских овец и нередко к их гибели. В Юго-Западных Кызылкумах у каракульских овец постоянно встречается заболевание с признаками желтухи и кровавой мочи. Самаркандской школой биохимиков под руководством М.А. Риша [1,2,3], установлено, что в печени овец, павших от этого заболевания, обнаруживается высокое содержание меди в печени ($315,9 \pm 56,9$ мг/кг свежей ткани), впервые предположившие его близость к гепатогенному хроническому отравлению, которое встречается у овец в Австралии [18].

В последующем указанное заболевание каракульских овец было названо эндемической иктерогемоглобинурией, и было показано, что оно непосредственно связано с нарушением обмена меди в их организме. Помимо избыточного накопления меди в печени, было установлено значительное увеличение ее концентрации в крови больных ($4,7 \pm 0,5$ мг/кг) и почках павших животных ($27,8 \pm 4,8$ мг/кг), а также в сердце ($6,03 \pm 0,4$ мг/кг), легких ($7,4 \pm 0,6$ мг/кг), селезенке ($9,65 \pm 0,9$ мг/кг), желчи ($3,2 \pm 0,3$ мг/кг) и моче ($8,15 \pm 1,9$ мг/л [2,3]. Было показано, что генерализованная желтуха у больных овец имеет гемолитическую природу, а избыточное накопление меди в печени обусловлено с ее функциональной неполноценностью [1,2].

В специально поставленных экспериментах было показано, что причиной функционального поражения печени и последующего накопления избыточных

количеств меди в ней является поедание овцами пастбищного растения гелиотропа волосистоплодного (*Heliotropium dasycarpum*) содержащего алкалоиды (гелиотрин и его N-окись), оказывающие гепатоксические действия [1,3]. Таким образом, было установлено, что эндемическая иктерогемоглобинурия каракульских овец имеет алкалоидно-медную этиологию и является гепатогенным хроническим медным отравлением. В то же время биохимические механизмы, лежащие в основе этого заболевания нельзя считать полностью выясненным.

В данном сообщении делается попытка обсудить эти механизмы с привлечением научных публикаций касающихся данной проблеме и результатов собственных исследований, которые были направлены на изучение субклеточного распределения меди в гепатоцитах, уровня активности медьсодержащих ферментов печени и регуляторных механизмов, отвечающих за гомеостаз меди в организме каракульских овец. Наши исследования показали [2,3], что при эндемической иктерогемоглобинурии происходит повышение содержания меди в печеночной ткани в 3 и более раз и при этом в накоплении меди в печени участвуют все фракции печеночных клеток, причем: концентрация меди в крупных гранулах повышается в 2,4 раза, в микросомной фракции - в 2,9 раза, в цитозоле - в 2,5 раза, в ядрах с обломками - в 3,4 раза.

Изучение активности кислой фосфатазы-маркерного фермента лизосом показали, что во фракции крупных гранул и ядерной фракции с обломками происходит резкое увеличение активности этого фермента (соответственно в 10 и 8 раз). Причем, судя по активности кислой фосфатазы, клеточные лизосомы печени почти равномерно распределяются между этими двумя фракциями. Также бы-

ло установлено, что общее содержание меди в печени, при котором её концентрация в обеих фракциях равна, составляет 400 мг/кг свежей ткани. До этой концентрации преобладает содержание меди во фракции крупных гранул, а при более высоких концентрациях - во фракции ядер с обломками. Это явление связано с тем, что при насыщении медью лизосомы «тяжелее» и при центрифугировании все больше седиментируют с фракцией ядер и клеточных обломков.

Это предположение подтверждается также тем, что существует корреляция между содержанием меди в «ядерной» фракции и активностью в ней кислой фосфатазы. Причем, активность кислой фосфатазы возрастает как в ядерной фракции и крупных гранулах, так и в печени в целом, которое свидетельствует о том, что при повышении содержания меди в гепатоците происходит не только перераспределение лизосом в субклеточных фракциях, но и увеличение их размеров и общего количества. Сопоставление наших данных с результатами других авторов, свидетельствует о том, что эндемическая иктерогемоглобинурия овец имеет значительное сходство с хроническим медным токсикозом овец и лабораторных животных. Во всех этих случаях происходит увеличение содержания меди в печени и при этом доля микроэлемента в ядерной фракции с обломками составляет от 59,4 % до 78 %, а на долю остальных трех фракций (крупных гранул, микросом и цитозоля) вместо взятых приходится от -22% до 40,6 % [2,12]. Если учесть, что при прямом медном токсикозе овец и при болезни Вильсона у человека происходит повышение активности ферментов лизосом, то следует считать, что процесс включения меди в лизосомы являются одним из механизмов защиты гепатоцитов от токсического действия этого элемента.

Одновременно следует отметить и то, что между эндемической иктерогемоглобинурией и хроническим медным отравлением овец наблюдается и определенные различия, заключающиеся в том, что при первом заболевании гемолитический криз наступает при значительно меньших концентрациях меди в печени овец, чем при хроническом медном отравлении (350-600 и 1250 мг/кг соответственно). Кроме этого при эндемической иктерогемоглобинурии доля меди, которая седиментирует с фракцией крупных гранул, в 1,5-2 раза выше, чем при медном токсикозе. Это может свидетельствовать в пользу предположения о том, что при эндемической иктерогемоглобинурии около половины популяции печеночных лизосом имеет относительно меньшую плотность и размеры, чем лизосомы в печени животных при медном токсикозе.

Такая картина становится вполне понятно, что если учесть накопление меди в печени овец при эндемической иктерогемоглобинурии происходит значительно медленнее, чем при прямом медном токсикозе. При этом гепатоцит продуцирует большее количество лизосом, чем при экспериментальном медном токсикозе.

Учитывая своеобразие обмена меди у овец можно произвести некоторые рассуждения о биохимических механизмах возникновения эндемической икте-

рогемоглобинурии, встречающееся у каракульских овец, выпасаемых в естественных пастбищах Юго-Западных Кызылкумов.

Известно, что в животном мире существует два типа обмена меди, отражающихся на концентрации этого элемента в печени. Первый тип, это-животные характеризующиеся накоплением в печени 100 и более мг/кг меди, а второй – это виды, содержащие в печени во взрослом состоянии не более 30 мг/кг меди на сухое вещество. Типичными представителями первой группы являются овцы, а второй крысы.

Математическое моделирование, данных полученных с радиоактивной медью ^{64}Cu , выявило принципиальную разницу между характером медного обмена у крыс и овец. У первых удается постулировать существование трех более или менее независимых компартментов гепатоцита, осуществляющих процессы: а) подготовка меди к выделению с желчью, б) временного депонирования меди и в) включение меди в состав церулоплазмينا [8].

Описание кинетики радиоактивной меди в организме овец дает возможность представить модель ее обмена, в которой три указанных компартмента представляют собой звенья одной цепи [17]. Данная модель предполагает, что медь преимущественно поступает на депонирование и в меньшей степени - в желчь и на синтез церулоплазмينا. Так, если у крыс вторичный подъем радиоактивности крови, вызванной секрецией в кровь вновь синтезированного церулоплазмينا, наблюдается через 14 часов после введения ^{64}Cu [9,10], то у овец он появляется в крови только спустя 70 часов после инъекции [10]. Другим важным межвидовым различием является наличие корреляции между содержанием меди в рационе и ее концентрации в печени у овец и отсутствием подобной корреляции у крыс.

С другой стороны, выделение желчи у крыс является основным путем удаления меди из организма, и концентрация в ней меди прямо пропорциональна содержанию этого элемента в печени [4], тогда как у овец с желчью выделяется лишь незначительная часть меди [14,18]. Причем низкий уровень выделения меди с желчью сохраняется и при хроническом медном отравлении, когда содержание меди в плазме крови составляет 5-15 мкг/мл, а в желчи - всего 2-4 мкг/мл. Значительная часть меди у овец выделяется через желудочно-кишечный тракт.

Основываясь на приведенных выше данных и результатов собственных исследований, можно попытаться отождествить перечисленные компартменты с определенными компонентами гепатоцита. Первый компартмент представляет собой, по-видимому, цитозоль, в котором медь, поступающая в составе комплексов с аминокислотами, вступает в соединение с апоцерулоплазмином и частично секретируется в форме комплексов с аминокислотами и желчными кислотами в желчь. Вторым компартментом является рибосомы и эндоплазматический ретикулум, где происходит синтез церулоплазмينا, супероксиддисмутазы и некоторых других медьсодержащих ферментов.

При математическом моделировании обмена радиоактивной меди основное внимание уделяется синтезу церулоплазмينا, поскольку значительная часть

его секретируется в кровяное русло, тогда как остальные ферменты не покидают гепатоцит. По этой причине математическая модель не рассматривает включение меди в состав митохондрий и хроматина. Третий компартмент представляет собой лизосомы, поглощающие металлотионеин из цитозоля.

Накопление полимерной формы медьтионеина в лизосомах доказано гистохимически [15] и биохимически [4,7]. Освобождение содержимого лизосом через мембрану гепатоцита путем экзоцитоза является вторым путем перехода меди в желчь. Цепной характер математической модели обмена меди дает основание полагать, что во всех трех компартментах преобладает медь, связанная с металлотионеином, из которого она поступает в прочие биохимические структуры.

Вданное время установлено, что металлотионеин является белком, участвующим в регуляции обмена меди в фетальный и ранней постнатальный периоды развития, после чего синтез этого белка у большинства видов животных репрессируется. У взрослых животных он может индуцироваться поступлением повышенных количеств ионов тяжелых металлов [17], под влиянием стресса, а также под влиянием глюкокортикоидов, из которых наиболее эффективен дексаметазон [4,17,18].

Для объяснения наблюдаемых у овец особенностей обмена меди можно предположить, что у них репрессия синтеза металлотионеина, наступающая у других видов животных вскоре после рождения, происходит лишь частично или отсутствует совсем. Такая возможность подтверждается присутствием цинк-тионеина в печени овец при медной недостаточности, наблюдающимся в наших исследованиях [2,3]. Поскольку металлотионеин связывает медь прочнее других, нуждающихся в ней белков, то при его избытке их синтез встречает определенные трудности. Не случайно во всех случаях повышенного синтеза металлотионеина отмечается угнетение синтеза церулоплазмينا, как например, в детском возрасте, при болезни Менкеса и Вильсона.

У овец его концентрация в крови по сравнению с человеком, крысами и свиньями снижена в 2-4 раза и синтез этого белка у овец происходит в 3 раза медленнее, чем у крыс. Известно, что медь-тионеин овец более прочно удерживает этот металл, чем аналогичный белок человека или крыс. Было выяснено также, что металлотионеин может существовать в нескольких изоформах. Так, у свиней и крыс в печени найдены три медь-тионеина с равным содержанием цинка [7], поддающийся разделению радиоиммунологическому определению [11]. Это допускает мысль о возможных различиях между изоформами медь-тионеина в отношении прочности связывания меди не только в пределах одного, но и у различных видов животных.

О существовании видовых различий в строении металлотионеина свидетельствует тот факт, что введение металлотионеина крыс в организм кролика [8] и овец [11] вызывает у них образование антител к данному белку. Описанные выше два типа обмена меди, по-видимому, могут переходить один в другой. При этом существенную роль играет относительное содержание в гепатоцитах металлотионеина. При

введении в организм крыс повышенных количеств тяжелых металлов, таких как цинк, кадмий, золото и др. [13,16], индуцируется повышенный синтез металлотионеина, который приводит к накоплению в их печени таких же концентраций меди, как у овец в условиях физиологической нормы. Так как у овец большая часть меди, поступающая в лизосомы поступает в виде металлотионеиновой форме, то следует считать, что в условиях физиологической нормы синтез металлотионеина у этих животных должен быть значительно выше, чем у крыс. С этих позиций особенности обмена меди у овец, а также других видов накопителей меди-собак, жаб, лебедей можно было бы объяснить конститутивным синтезом металлотионеина.

Металлотионеин по-видимому, является не единственным соединением, включаемым в лизосомы. В них поступает также церулоплазмин, после лишения углеводной части, продукты распада СОД и других медь-протеидов, но в количественном отношении преобладает металлотионеин.

Таким образом, на основании выше сказанного можно будет предложить нижеследующие предположения о механизмах возникновения, развития эндемической иктерогемоглобинурии каракульских овец встречающийся в Юго-Западных Кызылкумах. В этой биогеохимической провинции в составе пастбищного рациона овец присутствуют растения, содержащие в своем составе пирролизидиновые алкалоиды, которые оказывают повышенное усвоение меди в печени, задержку ее выделения с желчью и повышения связывания ее металлотионеином. В свою очередь под влиянием этих алкалоидов поражается кишечник, происходит угнетение клеточного митоза в крипах и атрофия ворсинок.

Кроме этого действия пирролизидиновых алкалоидов может быть и другим. Во-первых, они могут усиливать синтез металлотионеина путем дерепрессии соответствующего гена, аналогично действию тяжелых металлов. Этот процесс может осуществляться путем алкилирования соответствующих репрессорных белков. Усиления синтеза металлотионеина может наступать и в результате стресса, вызываемого токсикозом, и под влиянием регенеративных процессов, также усиливающих синтез данного белка [17]. Во-вторых, метаболиты пиррола вызывают повреждение плазматических мембран [6], что может нарушать способность лизосом выделять накопленную медь из гепатоцитов и удалять ее с желчью [11,16].

После того, как началось накопление меди, этот элемент сам может нарушать выделительную функцию лизосом, препятствуя синтезу тубулина и разрушая микротрубочки, необходимые для перемещения этих органелл [15]. В этом случае возникает порочный круг, когда под действием пирролизидиновых алкалоидов нарушается медный обмен на уровне гепатоцита ведущий к накоплению элемента в лизосомах в составе металлотионеина, который подвергается полимеризации и переходит в нерастворимую форму. Тем самым, происходит нарушение синтетических, выделительных и депонирующих процессов, связанных с обменом меди, осуществляе-

мых между субклеточными компонентами гепатоцитов.

В дальнейшем происходит нарушение строения мембран лизосом и их накопление и «тяжеление», где происходит депонирование меди в виде полимера, образующееся из металлотионеина. Аномальное накопление меди в печени, приводит к нарушению синтеза медьсодержащих белков необходимых для окислительно-остановительных процессов, происходящих во всем организме и конце до концов наступает гемолитический криз и гибель животного. Рассматривая вопрос с этих позиций, можно будет разработать эффективные методы профилактики и лечения эндемической иктерогемоглобинурии овец.

В частности, нам представляется перспективным включение в рацион животных из неблагополучных по эндемической иктерогемоглобинурии хозяйств повышенных доз цинка, который оказывает снижающее действие на всасывания меди в желудочно-

кишечном тракте, а также стабилизирует цитоплазматические мембраны. Кстати аналогичным действием обладает и витамин А. Вполне возможно, что именно эти факторы играют роль в прекращении вспышек иктерогемоглобинурии в Юго-Западных Кызылкумах в весенний период при выпасе овец на зеленых пастбищах.

Следует отметить, что по нашим наблюдениям вспышки этой болезни овец имеют, циклический характер оно коррелятивно связано с количеством осадков, выпавших на природные пастбище [3]. В те годы, когда пастбищный рацион разнообразен овцы покрывают свою суточную потребность в корме без потребления алкалоидоносных растений, признаки болезни не заметны или отсутствуют вовсе, а в периоды, когда рацион животных беден и овцы начинают покрывать свою кормовую потребность за счет содержащих алкалоиды растений, происходит вспышка данного заболевания.

Литература:

1. Риш М.А. Биогеохимические провинции Западного Узбекистана. Автореф. Дисс. докт.биол.наук – Москва. 1964. 40с.
2. Сафин М.Г. Медь в гепатоцитах каракульских овец в норме и при нарушениях ее обмена. Автореф. Дисс. канд. биол. наук – Боровск Калужской области. 1985. 18с
3. Сафин М.Г. Циклический характер вспышки эндемической иктерогемоглобинурии овец. Материалы третьей междунар. Конф. Часть четвертая. Ставрополь, Кисловодск. 2001. 10-11 с.
4. Evans G.R. Copperhomeoatasis. In: Spuren elemente (Gladtke E., Heimann G., eis) Georg Thitime Verlag, Stuttgart, 1979, p.160-166.
5. Hazelring J.B., Owen C.A., Askerman E. A mathematical model for copper metabolism and its relation to Wilson's disease. Am.J. Physiol., 1966, 211, p.1075-1081.
6. Johnson W.D. Mechanism of in vitro acute toxicity of degidromonocrotaline, a metabolite of the pyrrolizidine alkaloid monocrotaline. Toxicology, 1981, 1, p.107-108.
7. Leach K. The chemistry and biology of copper metallothioneins In: Metal ions in biological systems, New York, Basel, W.Bekker, 1982. 14 p. 299-318.
8. Madapallimatam G. and Riordan. Antibodies to the low molecular weight copper protein. Res. Comm., 1977, 77, №4, p. 1286-1293.
9. Marceau N., Aspin N. The association of the copper derived from ceruloplasmin with cytocuprein. Biochim. Biophys. Acta, 1973, 328, p.351-358.
10. Marciese N.A., Figuciras H.D. Valsecni R.M. Nuclear techniques in animal production and health. Proc. Simp. Vienna 76, International atomic energy commission, 1976. 234, p.117-121.
11. Mehra R.K. and Dremner J. Development of a radioimmunoassay for liver metallothionein-I and its application to the analysis of rat plasma and kidneys. Biochem. J., 1983, 213, p.459-465.
12. Saylor W.W. Roland M., Leach J.R. Intracellular distribution of copper and zinc in sheep. Effect of age and dietary levels of the metals. J. Nutr. 1980, 110, №3, p. 448-459/
13. Sharma R.P. McQueen E.G. Effect of gold sodiumthiomalate on cytosolic copper and zinc in the rat kidney and liver tissues. Clin. And. Exper. Pharmac. Physiol. 1981, 8, p. 591-599.
14. Soli W.E., Nafstad Chronic copper poisoning in sheep. Structural changes in erythrocytes and organs. Acta Vet. Scand. 1976, 17, p.316-327.
15. Sternlieb I. Copper and the liver. Gastroenterology, 1980.78, p.1615-1628.
16. Webb M. The metallothioneins. In: The chemistry, biochemistry and biology of cadmium. M. Webb ed., Elsevier (North Holland), 1979, p.2198-266.
17. Webb M., Cain K. Commentary. Functions of metallothionein. Biochem. Pharmacol., 1982, 31, №2, p.132-142.
18. Weber K.M., Boston R.C., Leaver D.D. A kinetic model of copper metabolism in sheep. Aust.J.Agric.Res., 1980, v. 31, №4, p.779-790.