

АНТИОКСИДАНТНА СИСТЕМА В ТКАНИНАХ ЩУРІВ ЗА УМОВ ІНТОКСИКАЦІЇ ВАЖКИМИ МЕТАЛАМИ

Б.О. Цудзевич, д.біол.н, професор, І.В. Калінін, к.біол.н., Н.А. Петрук

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

РЕЗЮМЕ. В роботі наведено дані експериментальних досліджень щодо впливу важких металів (міді сульфату, цинку сульфату, кадмію сульфату і свинцю азотнокислого) на пероксидне окислення ліпідів і на активність глутатіонзалежних ферментів крові та печінки інтоксикованих щурів.

Ключові слова: мідь, цинк, кадмій, свинець, кров, печінка, щури, антиоксидантна система.

РЕЗЮМЕ. В работе приведены данные экспериментальных исследований влияния тяжелых металлов (меди сульфата, цинка сульфата, кадмия сульфата и свинца азотнокислого) на пероксидное окисление липидов и активность глутатионзависимых ферментов крови и печени интоксикационных крыс.

Ключевые слова: медь, цинк, кадмий, свинец, кровь, печень, крысы, антиоксидантная система

SUMMARY. The data of researches influence of heavy metals (copper sulfate, zinc sulfate, cadmium sulfate and lead nitrate) on lipid peroxidation and on activity of glutathione-dependent enzymes of blood and liver of poisoned rats are shown in this article.

Key words: copper, zinc, cadmium, lead, blood, liver, rats, antioxidant system.

Негативні фактори навколишнього середовища, в тому числі й важкі метали, призводять до розладу антиоксидантного захисту внаслідок будь-якого зовнішнього впливу та викликають посилення вільнорадикального окислення (ВРО). Це супроводжується зміною конформації ліпідів, що призводить до порушення структурних і функціональних властивостей біомембран, підвищенню їхньої лабільності й проникності, розбалансуванню ферментних систем мембран, порушенню електротранспортних ланцюгів мітохондрій. Крім того, продукти ВРО ушкоджують білки, тіолові сполуки, нуклеотидфосфати, змінюють ступінь гліколізу, ушкоджують ядерну ДНК із утворенням її одностаничних розривів [1].

За оцінкою активності процесів ПОЛ і ВРО та ступеня зсуву рівноваги між прооксидантами й антиоксидантами можна розглядати об'єктивні й дуже чутливі показники загального стану організму, активності й функціонування систем підтримки гомеостазу [2]. Ці дані можуть містити інформацію про ступінь і глибину виразності дії деструктивного фактора на організм.

За рівнем даних продуктів можна судити про інтенсивність ВРО в різних біологічних системах і тканинах організму, тобто про ступінь їхнього ушкодження під дією несприятливих факторів середовища [3]. При оцінці активності ВРО необхідно мати на увазі, що клітина, організм мають у своєму розпорядженні безліч захисних механізмів, що більш-менш ефективно протидіють ВРО. Тому показником ступеня посилення ВРО може служити не тільки збільшення кількості продуктів ВРО, але й швидкість витрати, ступінь втрати антиоксидантних ресурсів.

Антиоксидантна система захисту організму контролює і гальмує всі етапи вільнорадикальних реакцій, починаючи від їх ініціації і закінчуючи утворенням гідроперексидів та МДА. Основний механізм контролю цих реакцій пов'язаний з ланцюгом зворотних окисно-відновних реакцій іонів металів, глутатіону, аскорбату, токоферолу та інших речовин, значення яких особливо важливе для збереження довгоіснуючих макромолекул нуклеїнових кислот і білків, деяких складових мембран. Є підстави думати, що тривалість життя макромолекул у клітині багато в чому визначається саме їх стійкістю до атаки вільно-радикальних продуктів [4].

Метою роботи було дослідження впливу інтоксикації важкими металами на функціонування антиоксидантної системи у тканинах щурів.

Матеріали і методи

Досліди проводили на білих нелінійних щурах-самцях, одного віку, масою 180-200 г, впродовж 14 діб. Було утворено п'ять груп тварин: перша — інтактні (контроль), друга — тваринам перорально вводили розчин міді сульфату в дозі 3 мг/кг, що становить 1/10 від ЛД₅₀, третя — щурам перорально вводили розчин цинку сульфату в дозі 2 мг/кг, що становить 1/20 від ЛД₅₀, четверта — тваринам перорально вводили розчин кадмію сульфату в дозі 1,5 мг/кг, що становить 1/30 від ЛД₅₀, п'ята — тваринам перорально вводили розчин свинцю азотнокислого в дозі 1,7 мг/кг, що становить 1/50 від ЛД₅₀. Щурів декапітували під ефірним наркозом і відбирали тканини крові та печінки для подальших досліджень. Вся робота проводилась відповідно до конвенції Ради Європи

щодо захисту хребетних тварин, яких використовують у наукових цілях. Кров отримували загальновідомими методами, а препарати гомогенної фракції клітин печінки — методом диференційного центрифугування [5]. Вміст ТБК-активних продуктів визначали за [6], дієнових кон'югатів (ДК) за [7]. Визначали активність: супероксиддисмутази (СОД, КФ 1.15.1.1) за методом [8]; каталази (КАТ, КФ 1.11.1.9) за [9]; глутатіонпероксидази (ГП, КФ 1.11.1.9) та глутатіонтрансферази (ГТ, КФ 2.5.1.18) за [10-11]. Вміст відновленого глутатіону (GSH) визначали методом [12]. Експериментальні дані обробляли статистично з використанням t-критерію Стьюдента [13].

Результати та обговорення

У тканинах крові та печінки щурів при інтоксикації іонами міді, цинку, кадмію і свинцю виявлено активацію пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), яке оцінювали по накопиченню ТБК-активних продуктів (табл. 1).

Інтоксикація міді сульфатом призводить до збільшення ТБК-активних продуктів на 40% у крові та на 31% у печінці; цинку сульфатом — на 42% в крові та на 31% в печінці, кадмію сульфатом — на 66% в крові та на 38% в печінці; свинцем азотнокислим — на 61% в крові та на 36% в печінці, відносно контрольної групи тварин.

Вміст дієнових кон'югатів у тканинах щурів (табл.2) визначали як відношення оптичної густини при 233 і 218 нм.

Після інтоксикації іонами важких металів збільшується вміст ДК у тканинах крові та в печінці щурів. Так, у крові вміст ДК збільшився на 16% при інтоксикації міді сульфатом, на 18% — цинку сульфатом, на 24% — кадмію сульфатом, на 26% — свинцем азотнокислим, порівняно з контрольною групою.

Антиоксидантна система захисту організму контролює і гальмує всі етапи вільнорадикальних реакцій, починаючи від їх ініціації і закінчу-

Таблиця 1

Вміст ТБК-активних продуктів у тканинах крові та печінки щурів за умов інтоксикації важкими металами ($M \pm m$, $n=8$)

Групи тварин	Вміст ТБК-активних продуктів	
	Кров, ммоль/л	Печінка, мкмоль/мг білка
Контроль	1,34±0,05	0,74±0,03
Інтоксиковані CuSO ₄	1,87±0,09*	0,97±0,04*
Інтоксиковані ZnSO ₄	1,91±0,04*	0,95±0,05*
Інтоксиковані CdSO ₄	2,23±0,08*	1,02±0,07*
Інтоксиковані Pb(NO ₃) ₂	2,16±0,05*	1,01±0,05*

Примітка: * — $P \leq 0,05$ — відносно контролю.

Таблиця 2

Вміст дієнових кон'югатів у тканинах крові та печінки щурів за умов інтоксикації важкими металами ($M \pm m$, $n=8$)

Групи тварин	Вміст дієнових кон'югатів (E233/E218)	
	Кров	Печінка
Контроль	0,84±0,04	0,97±0,05
Інтоксиковані CuSO ₄	0,98±0,07	1,02±0,09
Інтоксиковані ZnSO ₄	0,99±0,05	1,04±0,07
Інтоксиковані CdSO ₄	1,04±0,06*	1,10±0,08*
Інтоксиковані Pb(NO ₃) ₂	1,06±0,09*	1,08±0,04*

Примітка: * — $P \leq 0,05$ — відносно контролю.

Активність супероксиддисмутази (СОД) та каталази (КАТ)
в тканинах щурів за дії іонів важких металів ($M \pm m$, $n=8$)

Групи тварин	Кров		Печінка	
	СОД (ум.од)	КАТ (мкмоль/ л·хв)	СОД (ум.од)	КАТ (мкмоль/ мг·хв)
Контроль	0,83±0,05	11,2±1,1	2,83±0,32	0,18±0,03
Інтоксовані CuSO ₄	0,68±0,02	10,1±0,9	2,68±0,17	0,12±0,02*
Інтоксовані ZnSO ₄	0,70±0,04	10,7±0,7	2,71±0,15	0,14±0,03*
Інтоксовані CdSO ₄	0,60±0,03*	8,5±0,9*	1,37±0,14*	0,09±0,01*
Інтоксовані Pb(NO ₃) ₂	0,62±0,05*	8,9±0,8*	1,72±0,19*	0,11±0,01*

Примітка: * — $P \leq 0,05$ — відносно контролю.

Активність глутатіонпероксидази і глутатіонтрансферази
та вміст відновленого глутатіону в тканинах щурів за дії іонів важких металів ($M \pm m$, $n=8$)

Групи тварин	Кров			Печінка		
	ГП (ммоль/хв·л)	ГТ (ммоль/хв·л)	GSH (ммоль/л)	ГП (мкмоль/хв·мг білка)	ГТ (мкмоль/хв·мг білка)	GSH (мкмоль/мг· білка)
Контроль	0,273±0,12	68,0±4,71	0,379±0,04	0,37±0,02	0,48±0,05	0,80±0,04
Інтоксовані CuSO ₄	0,214±0,11*	35,7±3,68*	0,294±0,03*	0,34±0,03	0,46±0,07	0,67±0,05
Інтоксовані ZnSO ₄	0,211±0,14*	34,1±3,52*	0,276±0,07*	0,36±0,05	0,44±0,03	0,62±0,07
Інтоксовані CdSO ₄	0,170±0,09*	27,4±2,90*	0,252±0,02*	0,28±0,04*	0,39±0,02*	0,31±0,03*
Інтоксовані Pb(NO ₃) ₂	0,181±0,10*	29,7±3,10*	0,263±0,05*	0,30±0,03*	0,41±0,04*	0,39±0,05*

Примітка: * — $P \leq 0,05$ — відносно контролю.

ючи утворенням гідроперекисів та МДА.

Дослідження активності супероксиддисмутази та каталази наведено в таблиці 3.

Отже, інтоксикація іонами важких металів призводить до зниження активності СОД і КАТ у досліджуваних тканинах щурів, особливо при інтоксикації іонами кадмію та свинцю.

Дослідження активності глутатіонзалежних ферментів тканин щурів наведено в таблиці 4.

У крові щурів за умов інтоксикації міді сульфатом зменшується: активність ГП на 22%, ГТ на 47% і вміст відновленого глутатіону на 23%; цинку сульфату — активність ГП на 23%, ГТ на 50% і вміст відновленого глутатіону на 27%; кадмію сульфату — ГП на 38%, ГТ на 60% і

вміст відновленого глутатіону на 34%; свинцю азотнокислого — ГП на 34%, ГТ на 57% і вміст відновленого глутатіону на 31% відповідно, у порівнянні з контрольною групою тварин.

За умов інтоксикації міддю сірчанокислою і цинку сульфатом активність ГП і ГТ у печінці щурів змінюється незначно. Активність у печінці ГП і ГТ за умов дії іонів кадмію зменшується на 25% і 19% відповідно, порівняно з контролем. При дії іонів свинцю активність ГП і ГТ у печінці щурів зменшилась на 19% і 15% відповідно, у порівнянні з контрольними тваринами.

Слід відзначити, що більш інтенсивно зменшувався вміст відновленого глутатіону в

печінці інтоксикованих щурів: CuSO_4 — на 17% , ZnSO_4 — на 23%, CdSO_4 — на 61%, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ — на 51%, відносно контрольної групи тварин. Таку зміну, на наш погляд, можна пояснити тим, що глутатіон бере участь у захисних реакціях клітинних органел.

Висновок. Аналіз одержаних результатів

вказує на порушення проокисно-антиоксидантної рівноваги. Слід відзначити, що саме глутатіонпероксидазна система, є універсальною при розкладі пероксидів і перешкоджає ініціації вторинних реакцій окиснення ліпідів та бере участь у інактивації продуктів окисного метаболізму ксенобіотиків.

ЛІТЕРАТУРА

1. Антиоксидантна система захисту організму (огляд) / І.Ф. Беленічев, Є.Л. Левицький, Ю.І. Губський [та ін.] // Совр. пробл. токсикол. — 2002. — №3. — С. 24–31.
2. Wickens A.P. Ageing and the free radical theory / A.P. Wickens // *Respir. Physiol.* — 2001. — Vol.128, №3. — P. 379–391.
3. Функціонування антиоксидантної системи щурів за дії кадмію / С.В. Хижняк, А.О. Прохорова, В.А. Грищенко [та ін.] // *Укр. біохім. журнал*, 2010. — Т. 82. — № 4. — С. 105–111.
4. Коржов В.И. Роль системы глутатиона в процессах детоксикации и антиоксидантной защиты / В.И. Коржов, В.Н. Жадан, М.В. Коржов // *Журнал АМН України*, 2007. — №1. — Т. 13. — С. 3–20.
5. Практикум по биохимии: учебное пособие / [под редакцией С.Е.Северина, Г.А. Соловьевой]. — М.: Из-во МГУ, 1989. — 509 с.
6. Стальная И.Д. Современные методы в биохимии / И.Д. Стальная, Т.Г. Гаришвили / [под ред. В.Н. Ореховича]. — М. Медицина, 1977. — С. 66–68.
7. Гаврилов В.Б. Измерение диеновых конъюгатов в плазме крови по УФ-поглощению гептановых и изопропанольных экстрактов / В.Б. Гаврилов, А.Р. Гаврилова, Н.Ф. Хмара // *Лабораторное дело*. — 1988. — № 2. — с. 60–63.
8. Орехович В.Н. Современные методы в биохимии. / В.Н. Орехович. — М.: Медицина, 1977. — 268 с.
9. Королюк М.А. Метод определения активности каталазы в биологическом материале / М.А. Королюк // *Лабораторное дело*. — 1988. — №2. — С. 31–34.
10. Mannervik V. Glutathione peroxidase/ V. Mannervik // *Methods in enzymology. Acad. Press.*—1985. — Vol. 113. — P. 490– 495.
11. Власова С.Н. Активность глутатионзависимых ферментов эритроцитов при хронических заболеваниях печени у детей / С.Н. Власова, Е.И. Шабунина, А.И. Переслегина // *Лаб. Дело*. — 1990. — № 8. — С. 19–21.
12. Ellman G.L. Tissue sulfhydryl groups / G.L. Ellman // *Arch. Biochem. Biophys.* — 1959. — V. 82, N1. — P. 70–77.
13. Кучеренко М.Є. Сучасні методи біохімічних досліджень. / М.Є. Кучеренко, Ю.Д. Бабенюк, В.М. Войціцький — К.: Фітосоціоцентр, 2001. — С. 109–152.

Надійшла до редакції 28.02.2012