

Науковий часопис Національного педагогічного університету імені М.П. Драгоманова.
Серія 20. Біологія. – 2013. – випуск 5. – С. 112 – 117

УДК 577.3 + 615.9

**1.¹ Г.Л. Антоняк, ^{1,2} Н. К. Коваль,
^{1,2} М. Р. Досвядчинська, ¹ Х. М. Головчак**
¹Інститут біології тварин НААН України,
вул. Стуса 38, Львів, 79003
²Дрогобицький державний педагогічний
університет імені Івана Франка,
вул. Т. Шевченка 23, Дрогобич, 82100

ВПЛИВ АФЛАТОКСИНУ В1 НА СТАН АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ В КЛІТИНАХ ОРГАНІВ ТА ЕРИТРОЦИТАХ КРОВІ БІЛИХ ЩУРІВ

Афлатоксин В1, пероксидне окиснення ліпідів, антиоксидантна система, печінка, легені, головний мозок, серцевий м'яз, еритроцити.

Афлатоксин В1 (AFB1) – це один з найнебезпечніших природних токсинів, який може надходити в корми тварин і продукти живлення за умов забруднення їх грибами-мікроміцетами роду *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. parasiticus*) [1, 5, 18]. Цей мікотоксин проявляє мутагенні, канцерогенні, тератогенні та імуносупресивні властивості і може спричиняти до інтенсивних уражень організму тварин і людини впродовж короткого періоду часу [11, 16, 20]. В механізмах дії AFB1, як і інших афлатоксинів, важливе значення має стимуляція процесів утворення активних форм Оксигену (АФО) та пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) у клітинах [10, 15]. Відомо, що цей токсин активує процеси ПОЛ прямим і опосередкованим шляхом [19, 22]. Дисбаланс, який постає в системі прооксиданти-антиоксиданти внаслідок надходження афлатоксину в організм значною мірою впливає на перебіг біохімічних і фізіологічних процесів, пригнічуючи функції життєво важливих органів і систем. Незважаючи на низку експериментальних робіт [2, 8, 20], вплив AFB1 на антиоксидантну систему клітин вивчений недостатньою мірою, що зумовлює актуальність досліджень у цьому напрямі.

Метою роботи було з'ясувати динаміку процесів ПОЛ, активності ензимів антиоксидантної системи (супероксиддисмутаза (СОД), глутатіонпероксидаза (ГП)) та вмісту відновленого глутатіону (GSH) в клітинах органів (печінка, легені, головний мозок, серцевий м'яз) білих щурів за умов щодобового надходження афлатоксину В1 в дозі 0,025 мг/кг маси та вплив AFB1 (0,015 мг/кг маси щодоби) на активність антиоксидантних ензимів в еритроцитах крові тварин.

Матеріали та методи дослідження

Експерименти проводили на дорослих білих безпородних щурах-самцях масою 170 – 200 г, яких утримували за умов віварію. Тварин поділили на три групи: контрольну (К) і дві дослідні (Д1, Д2), по 5 особин у кожній. Щурам групи Д1 вводили перорально (за допомогою зонда) розчин AFB1 («Sigma», США) в кип'яченій оливковій олії дозою 0,025 мг/кг маси щодоби впродовж 14-ти діб, тваринам групи Д2 – олійний розчин AFB1 дозою 0,015 мг/кг таким самим способом упродовж 14-ти діб.

Щурам контрольної групи перорально вводили кип'ячену оливкову олію у відповідному об'ємі.

Евтаназію тварин здійснювали під легким ефірним наркозом, дотримуючись правил поводження з експериментальними тваринами, через 24 год після закінчення експериментів. Зразки печінки, легень, головного мозку і серцевого м'язу, відібрані зразу ж після евтаназії, охолоджували до температури 1 -3 °С в фізіологічному розчині, підсушували фільтрувальним папером, а потім подрібнювали ножицями та гомогенізували в 0,05 М тріс-НСІ буфері (рН 7,5) з додаванням 0,25 М сахарози за допомогою гомогенізатора MPW-324 (Польща). Співвідношення маси тканини до об'єму буферу становило 1 : 9. Одержані гомогенати центрифугували при 10 000 g впродовж 30 хв на рефрижераторній центрифугі MLW-T23D (Німеччина), використовуючи для досліджень надосадову рідину.

Периферійну кров збирали в пробірки з гепарином, відділяли плазму центрифугуванням, а еритроцити тричі промивали 0,9 % NaCl, щоразу центрифугуючи суспензію клітин при 3 000 g впродовж 5 хв. Гемолізати отримували триразовим заморожуванням та відтаюванням суспензій з подальшим центрифугуванням при 10 000 g впродовж 15 хв.

У гомогенатах клітин визначали концентрацію продуктів ПОЛ методом, в основі якого лежить їхня взаємодія з тіобарбітуровою кислотою (ТБК-активні продукти) [17]. Супероксиддисмутазну активність у гомогенатах клітин органів та гемолізатах досліджували, враховуючи рівень гальмування ензимом процесу відновлення нітросинього тетразолію за наявності NADH і феназинметасульфату [7]. Глутатіонпероксидазну активність визначали за рівнем накопичення окисненого глутатіону (GSSG) [3]. Каталазну активність в гемолізатах досліджували за швидкістю розпаду гідроген пероксиду [4], глутатіонредуктазну – за швидкістю окиснення молекул NADPH [13]. Вміст відновленого глутатіону в гомогенатах клітин аналізували за інтенсивністю реакції з 5,5-дитіобіс-2-нітробензойною кислотою [7]. Концентрацію білка визначали методом О. Лоурі (1951).

Отримані результати опрацьовували статистично з використанням методів варіаційної статистики.

Результати дослідження та їх обговорення

Результати досліджень свідчать про те, що через 14 діб введення AFB1 рівень кінцевих продуктів ПОЛ (ТБК-активні продукти) істотно зростає в клітинах усіх досліджуваних органів. Найвиразніші зміни цього показника виявляються в клітинах печінки (збільшення майже вдвічі, $p < 0,001$). У гомогенатах клітин легень, головного мозку та серцевого м'язу концентрація ТБК-активних продуктів збільшується відповідно на 90 %, 89 % і 82,9 % ($p < 0,001$) (табл. 1). Отримані результати вказують на високу сприйнятливості досліджуваних клітин до впливу AFB1 як прооксиданта, що стимулює процеси пероксидного окиснення ліпідів за умов тривалого надходження в організм тварин. Ці результати узгоджуються з даними літератури, згідно з яким афлатоксин В1, як і деякі інші природні токсини, індукує процес утворення активних форм кисню в клітинах [10, 15, 19].

Відомо, що інтенсифікація процесів ПОЛ у клітинах може спричинити до низки шкідливих ефектів, таких як оксидативна модифікація та пошкодження структурних компонентів мембран, пригнічення каталітичної активності ферментів тощо [14]. Тому за умов посиленого перебігу процесів ПОЛ важливу роль відіграє функціональна активність внутрішньоклітинних захисних систем. До них, насамперед, належить антиоксидантна система, представлена комплексом неферментних антиоксидантів і

ФІЗІОЛОГІЯ ЛЮДИНИ І ТВАРИН

спеціалізованих ензимів, які каталізують процеси детоксикації АФО. Компоненти антиоксидантної системи беруть участь у регуляції інтенсивності утворення вільних радикалів і знешкодження продуктів пероксидного окиснення ліпідів [14, 23].

Таблиця 1

Динаміка вмісту ТБК-активних продуктів і відновленого глутатіону (GSH) та активності ензимів антиоксидантної системи в клітинах органів білих щурів за умов щодобового введення AFB1 дозою 0,015 мг/кг маси впродовж 14 діб (M±m, n=5)

| Клітини, умови досліджень | | ТБК-активні продукти, нмоль/г тканини | СОД, ум. од./хв. на 1·мг білка | ГП, нмоль/хв на 1 мг білка | GSH, мкмоль/г тканини |
|---------------------------|------|---------------------------------------|--------------------------------|----------------------------|-----------------------|
| Печінка | К | 433,7±14,2 | 6,11±0,35 | 142,1±3,80 | 2,39±0,08 |
| | AFB1 | 863,0±23,5*** | 4,09 ±0,22* | 89,94±2,85*** | 0,99±0,07*** |
| Легені | К | 240,9±7,36 | 6,37±0,24 | 125,7±4,57 | 1,843±0,09 |
| | AFB1 | 457,7±17,5*** | 4,58±0,28* | 88,9±3,22*** | 0,980±0,09** |
| Мозок | К | 293,5±11,0 | 6,05±0,19 | 130,0±6,55 | 1,185±0,07 |
| | AFB1 | 554,7±14,4*** | 4,17±0,25** | 90,51 ±2,95** | 0,69±0,05** |
| Серце | К | 274,2±9,68 | 6,19±0,27 | 120,8±4,20 | 1,549±0,09 |
| | AFB1 | 501,5±22,4*** | 4,40±0,24* | 87,120±3,74** | 0,814±0,07*** |

*Примітка: в цій і наступній таблицях *, **, *** – вірогідність різниць між контрольною і дослідною групами тварин (* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$)*

В експериментальних роботах наявні дані як про активацію системи антиоксидантного захисту у відповідь на підвищення рівня утворення вільних радикалів та органічних гідропероксидів [24], так і про виснаження адаптивних можливостей захисної системи в умовах інтенсивного утворення АФО [12]. Результати наших досліджень свідчать, що за умов тривалої інтоксикації афлатоксином В1 в клітинах органів щурів дослідної групи відбувається зниження активності ферментів-антиоксидантів. Зокрема, супероксиддисмутазна активність в досліджуваних клітинах зменшується на 28-33 % ($p < 0,05 - 0,01$) (табл. 1). Характерна для клітин піддослідних тварин динаміка активності СОД може зумовлюватись нагромадженням у цих клітинах продуктів пероксидного окиснення ліпідів, які пригнічують активність ензиму [14].

Глутатіонпероксидаза – глутатіонзалежний ензим, який відіграє важливу роль у детоксикації гідроген пероксиду, утвореного в супероксиддисмутазній реакції, у такий спосіб запобігає прогресуванню процесів пероксидації ліпідів [6]. Проте, за умов тривалого введення AFB1 глутатіонпероксидазна активність у клітинах печінки, легенів, мозку і серцевого м'язу тварин пригнічується на 14-ту добу експерименту відповідно на 36,7 %, 29,3 %, 30,4 % і 27,9 % ($p < 0,01 - 0,001$) (табл. 1). Результати досліджень вказують на те, що встановлений ефект може зумовлюватись зменшенням вмісту відновленого глутатіону в досліджуваних клітинах. Згідно з отриманими даними концентрація GSH найбільшою мірою знижується в гомогенатах клітин печінки (на 58,6 %, $p < 0,001$), а найменше – в мозку (на 41,8 %, $p < 0,01$). В клітинах легенів і серця цей показник меншає відповідно на 46,8% і 47,4% ($p < 0,01-0,001$). В свою чергу, у зменшенні вмісту GSH важливу роль може відігравати його кон'югація з афлатоксином В1 і продуктами метаболізму цього токсину [9, 21].

ФІЗІОЛОГІЯ ЛЮДИНИ І ТВАРИН

Результати досліджень свідчать, що пригнічення активності ензимів антиоксидантної системи відбувається також і в еритроцитах щурів, яким вводили афлатоксин В1 щодобово 0,015 мг/кг маси. З одержаних даних видно, що на 14-ту добу експерименту активність СОД, каталази і глутатіонредуктази в досліджуваних клітинах зменшується відповідно на 37,7 %, 54,6 % і 68,6 % (табл. 2).

Таблиця 2

Активність ензимів антиоксидантної системи в еритроцитах білих щурів за умов уведення афлатоксину В1 ($M \pm m$, $n=5$)

| Показник | Контроль | Введення АFB1 (0,015 мг/кг маси щодоби) впродовж 14 діб |
|---|------------|---|
| СОД, ум. од./мг білка | 3,63±0,27 | 2,26±0,25* |
| Каталаза, нмоль/хв. на 1 мг білка | 18,28±1,76 | 8,30±1,19** |
| Глутатіонредуктаза, нмоль/хв. на 1 мг білка | 24,65±1,99 | 7,74±0,75*** |

Отже, одержані результати дають підставу стверджувати, що тривале надходження афлатоксину В1 в дозах 0,025 і 0,015 мг/кг маси істотно змінює прооксидантно-антиоксидантний стан у клітинах органів (печінки, легень, головного мозку, серцевого м'язу) та еритроцитах крові тварин. Вплив АFB1 виявляється в стимуляції процесів пероксидного окиснення ліпідів та пригніченні активності ензимів антиоксидантної системи в досліджуваних клітинах.

Висновки

1. Щодобове пероральне введення АFB1 дозою 0,025 мг/кг маси впродовж 14-ти діб спричинює інтенсифікацію процесу утворення ТБК-активних продуктів в клітинах печінки, легенів, головного мозку та серцевого м'язу білих щурів, що свідчить про активацію процесів пероксидного окиснення ліпідів у досліджуваних клітинах.

2. Афлатоксин В1 пригнічує активність ферментів антиоксидантної системи (супероксиддисмутаза, глутатіонпероксидаза) та спричиняє до зменшення вмісту відновленого глутатіону в клітинах печінки, легенів, головного мозку та серцевого м'язу щурів.

3. Пероральне введення АFB1 дозою 0,015 мг/кг маси щодоби впродовж 14-ти діб зумовлює інгібування супероксиддисмутазної, каталазної та глутатіонредуктазної активності в еритроцитах крові щурів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Антоняк Г. Л. Афлатоксини: біологічні ефекти та механізми впливу на організм тварин і людини / Г. Л. Антоняк, Н. О. Бабич, О. М. Стефанишин, Н. К. Коваль, Р. О. Федяков // Біологія тварин. – 2009. – Т. 11, № 1 – 2. – С. 16 – 26.
2. Антоняк Г. Л. Вплив афлатоксину В1 на процеси пероксидного окиснення ліпідів та стан антиоксидантної системи в еритроцитах та гепатоцитах щурів / Г. Л. Антоняк, Р. О. Федяков, Н. К. Коваль // Вісник Одеського національного університету ім. І. Мечнікова. Серія біологічна. – 2011. – Т. 16., Вип. 6. – С. 5 – 11.
3. Дубинина Е. Е. Активность и изоферментный спектр супероксиддисмутазы эритроцитов и плазмы крови человека / Е. Е. Дубинина, Л. А. Сальникова, Л. Ф. Ефимова // Лаб. дело. – 1983. – № 10. – С. 30 – 33.

4. Корольюк М. А. Метод определения активности каталазы / М.А. Корольюк, И.Г. Иванова, И.Г. Майорова, В.Е. Токарев // Лаб. дело. – 1988. – №1. – С. 16 – 18.
5. Котик А. М. Мікотоксикози птиці: етіологія, діагностика, профілактичні засоби і методи / А. М. Котик, В. О. Труфанова. – Харків: НТМТ, 2005. – 124 с.
6. Кулинский В. И. Структура, свойства, биологическая роль и регуляция глутатионпероксидазы / Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. // Успехи современной биологии. – 1993. – Т. 113, Вып. 1. – С. 107 – 121.
7. Прохорова М. И. Методы биохимических исследований / М. И. Прохорова // Л.: Изд-во Ленинградского ун-та, 1982. – 272 с.
8. Федяков Р. О. Стан системи прооксиданти–антиоксиданти в нирках щурів, яким вводили AFB1 / Р. О. Федяков, Г. Л. Антоняк, О. М. Стефанишин // Біологія тварин. – 2011. – Т. 11, №1-2. – С. 291 – 296.
9. Allameh A. Kinetic studies of aflatoxin B1-glutathione conjugate formation in liver and kidneys of adult and weanling rats / A. Allameh, M. Farahani, A. Zarghi // Mech Ageing Dev. – 2000, May 18. – Vol. 115(1-2). – P. 73 – 83.
10. Alpsy L. Key roles of vitamins A, C, and E in aflatoxin B1-induced oxidative stress / L. Alpsy, ME. Yalvac // Vitam Horm. – 2011. – Vol. 86. – P. 287 – 305.
11. Eaton DL. Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis / DL Eaton, EP Gallagher // Annu Rev Pharmacol Toxicol. – 1994. – Vol. 34. – P. 135 – 72.
12. El-Agamy D. S. Comparative effects of curcumin and resveratrol on aflatoxin B(1)-induced liver injury in rats / D. S. El-Agamy // Arch. Toxicol. – 2010. – Vol. 84. – N 5. – P. 389 – 396.
13. Goldberg D.M. Glutathione reductase / D.M. Goldberg, R.J. Spooner // Methods of enzymatic analysis, 3rded. // Weinheim, 1983. – Vol. 111. – P. 258 – 265.
14. Halliwell B. Free radicals in biology and medicine / B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge // Oxford: University Press, 2007. – 851 p.
15. Liu J. Effect of Salvia miltiorrhiza on aflatoxin B1-induced oxidative stress in cultured rat hepatocytes / J Liu, CF Yang, BL Lee, HM Shen, SG Ang, CN Ong // Free Radic Res. – 1999. – Vol. 31(6). – P. 559 – 68.
16. Madrigal-Santillán E. Antigenotoxic studies of different substances to reduce the DNA damage induced by aflatoxin B(1) and ochratoxin A / E. Madrigal-Santillán, JA. Morales-González, N. Vargas-Mendoza, P. Reyes-Ramírez, S. Cruz-Jaime // Toxins (Basel). – 2010, Apr. – Vol. 2(4). – P. 738 – 57.
17. Ohkawa H. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction / H. Ohkawa, N. Ohishi, K. Yagi // Anal. Biochem. – 1979. – Vol. 95. – P. 351 – 358.
18. Rawal S. Aflatoxin B1 in poultry: toxicology, metabolism and prevention / S. Rawal, JE. Kim, R Jr. Coulombe // Res Vet Sci. – 2010. – Vol. 89(3). – P. 325 – 31.
19. Shen H. Aflatoxin B1-induced lipid peroxidation in rat liver / H. M. Shen, C. Y. Shi, H. P. Lee // Toxicol Appl Pharmacol. – 1994. – Vol. 127. – P. 145–150.
20. Sirajudeen M. Protective effects of melatonin in reduction of oxidative damage and immunosuppression induced by aflatoxin B1-contaminated diets in young chicks / M. Sirajudeen, K. Gopi, JS. Tyagi, RP. Moudgal, J. Mohan, R.Singh // Environ Toxicol. – 2011. – Apr 26(2). – P. 153 – 60.
21. Stewart RK. Glutathione S-transferase-catalyzed conjugation of bioactivated aflatoxin B1 in rabbit lung and liver / RK. Stewart, CJ. Serabjit-Singh, TE. Massey // Toxicol Appl Pharmacol. – 1996. – Oct 140(2). – P. 499 – 507.
22. Towner R. In vivo identification of aflatoxin-induced free radicals in rat bile / R. A. Towner, S. Y. Qian, M. B. Kadiiska, R. P. Mason // Free Radic. Biol. – 2003. – Vol. 35. – P. 1330 – 1340.

23. Valko M. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease / M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M.T. Cronin, M. Mazur, J. Telser // *Int J Biochem Cell Biol.* – 2007. – Vol. 39(1). – P. 44 –84.
24. Velayutham M. Removal of H₂O₂ and generation of superoxide radical: role of cytochrome c and NADH / M. Velayutham, C. Hemann, J. L. Zweier // *Free Radic. Biol. Med.* – 2011. – Vol. 51. – N 1. – P. 160 – 170.

**Г. Л. Антоняк, Н. К. Коваль,
М. Р. Досвядчинская, Х. М. Головчак**

ВЛИЯНИЕ АФЛАТОКСИНА В1 НА СОСТОЯНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ В КЛЕТКАХ ОРГАНОВ И ЭРИТРОЦИТАХ КРОВИ БЕЛЫХ КРЫС

В статье приведены результаты исследований влияния афлатоксина В1 (AFB1) на процесс перекисного окисления липидов (ПОЛ), активность ферментов антиоксидантной системы и содержание восстановленного глутатиона в клетках органов (печень, легкие, головной мозг, сердечная мышца) и в эритроцитах крови белых крыс при условиях ежедневного перорального введения в дозах 0,025 и 0,015 мг/кг массы животных на протяжении 14-ти суток. Установлено, что на 14-тые сутки введения AFB1 в клетках исследуемых органов животных происходит интенсификация процессов ПОЛ с накоплением ТБК-активных продуктов, подавление активности антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы) и уменьшения концентрации восстановленного глутатиона. В эритроцитах при условиях интоксикации крыс афлатоксином В1 происходит ингибирование супероксиддисмутазной, каталазной и глутатионредуктазной активности. Полученные результаты свидетельствуют о значительных изменениях прооксидантно-антиоксидантного состояния клеток при условиях длительного перорального поступления афлатоксина В1.

**H. L. Antonyak, N. K. Koval,
M. R. Dosvyadchynska, Ch. M. Golovchak**

EFFECTS OF AFLATOXIN B1 ON ANTIOXIDANT SYSTEM IN CELLS OF ORGANS AND ERYTHROCYTES OF BLOOD OF WHITE RATS

The effects of a daily oral injection of aflatoxin B1 (AFB1, 0,025 mg/kg, 0,015 mg/kg) during 14th days on the processes of lipid peroxidation (LPO), activities of enzymes of antioxidant system and content of reduced glutathione in the cells of organs (liver, lungs, brain, heart muscle) and erythrocytes of white rat were studied. The intensification of LPO, inhibition of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, glutathione peroxidase) and decline of content of reduced glutathione in animal cells on the 14th days of AFB1 injection was established. The inhibition of superoxide dismutase, glutathione reductase and catalase activity in erythrocytes under aflatoxin B1 intoxication in rats was established. The results indicate significant changes of prooxidant-antioxidant status of cells under prolonged oral injection of aflatoxin B1.

Надійшла 20.11.2012 р.