*Огляди літератури, **оригінальні дослідження**, погляд на проблему*
УДК 617.141-412/44:427

ФУЛЕРЕНИ C_{60} ПОСИЛЮЮТЬ ВИКЛИКАНИЙ ТОЛУОЛОМ ОКСИДАТИВНИЙ ТА НІТРООКСИДАТИВНИЙ СТРЕС

©Л. М. Палиця, С. О. Ястремська, М. М. Корда

ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України»

РЕЗЮМЕ. Наночастки і наноматеріали набувають характеру нового глобального антропогенного чинника, який може характеризуватись потенційною небезпекою для здоров'я населення. Метою даної роботи було дослідити вплив фулеренів C_{60} на здатність відомого хімічного токсиканта толуолу викликати оксидативний та нітрооксидативний стрес у сироватці крові і печінці експериментальних щурів. Тваринам інтраперитонеально вводили суспензію фулеренів (60 мг/кг), толуол (0,5 мл/кг) і толуол з розчиненими в ньому фулеренами. В динаміці (3–72 год) в сироватці і печінці тварин визначали сумарну активність NO-синтази, супероксиддисмутази, каталази, вміст NO_x, ТБК-активних продуктів, окиснено-модифікованих білків, відновленого глутатіону, церулоплазміну і загальну антиоксидну активність сироватки. Максимальні зміни практично всіх показників у всі терміни дослідження зареєстровано у групі тварин, яким вводили фулерени, розчинені в толуолі. При цьому вміст NO_x, ТБК-активних продуктів, окиснено-модифікованих білків, відновленого глутатіону і активність супероксиддисмутази у тварин, яким вводили наночастинки і токсикант, змінювалися достовірно, порівняно з тваринами, яким вводили тільки токсикант. Зроблено висновок, що фулерени C_{60} посилюють здатність толуолу викликати оксидативний і нітрооксидативний стрес в сироватці крові і печінці.
КЛЮЧОВІ СЛОВА: фулерени, толуол, оксидативний і нітрооксидативний стрес.

Вступ. На сьогоднішній день в багатьох країнах світу спостерігається швидкий розвиток нанотехнологій, тобто науково-практичних методів маніпулювання речовинами на рівні менше 100 нанометрів [2, 9]. Наночастки, зважаючи на широке за масштабами використання багатьма країнами світу у різних сферах виробництва, побуті і медицині, набувають характеру нового глобального антропогенного чинника, який може характеризуватись потенційною небезпекою для здоров'я населення [4, 15, 13]. Серед усіх наноматеріалів карбонові наночастинки, зокрема, фулерени, зважаючи на їх унікальні фізико-хімічні властивості, мають чи не найбільший потенціал і перспективу використання. Вони застосовуються у виробництві електронних приладів, сенсорів, фільтрів для води, було також показано ефективність використання фулеренів в медицині і біології, зокрема, для цільової доставки ліків до певних тканин, для стимуляції росту клітин кісток, для лікування раку і ін. Попередні токсикологічні дослідження показали, що для наночастинок характерною є здатність проникати крізь біологічні мембрани і фізіологічні бар'єри організму і слугувати «провідниками» в організм важких металів, пестицидів, сполук галогенів тощо. Тому постає питання про необхідність фундаментального розуміння токсикологічних властивостей наночастинок при їх попаданні в організм разом з «класичними» хімічними токсикантами.

Мета дослідження. Дослідити вплив фулеренів C_{60} на здатність відомого хімічного токсиканта толуолу викликати оксидативний та нітрооксидативний стрес у сироватці крові і печінці експериментальних щурів.

Матеріали і методи дослідження. Досліди виконані на 104 безпородних щурах-самцях масою 150–180 г, яких утримували на стандартній дієті. Всіх тварин поділили на 4 групи: I – контрольна (інтактні щури), яким інтраперитонеально вводили фізрозчин (0,5 мл/кг); II – щури, яким інтраперитонеально вводили 60 мг/кг суспензії фулерену C_{60}; III – тварини, яким інтраперитонеально вводили толуол в дозі 0,5 мл/кг, IV – щури, яким вводили фулерен (60 мг/кг), розведений в толуолі (0,5 мл/кг). Тварин виводили з експерименту під тіопенталовим наркозом через 3, 6, 24 і 72 год. Досліджували сироватку крові і гомогенат печінки.

Утримання тварин та експерименти проводили відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях».

У печінці визначали сумарну активність NO синтази [7] і активність супероксиддисмутази (СОД) [14]. В сироватці крові визначали загальний вміст нітратів і нітритів (NO_x) [5], рівень ТБК-активних продуктів (ТБК–АП) [8], окиснено-модифікованих білків (ОМБ) [12], активність каталази (КТ) [11], вміст відновленого глутатіону (ГSH) [1], церулоплазміну (ЦП) [10] і загальну антиоксидну активність (ЗАА) [6].

Математична обробка отриманих даних проводилась у відділі статистичних досліджень Тернопільського державного медичного університету імені І. Я. Горбачевського з використанням статистичних прикладних програм Microsoft Excel 2007 і STATISTICA V6.

Результати й обговорення. За умов введення щурам чистої суспензії фулеренів C_{60} у дозі

60 мг/кг показники інтенсивності процесів вільнорадикального окиснення, функціонального стану системи синтезу оксиду азоту і системи антиоксидного захисту не змінювалися достовірно, порівняно з аналогічними показниками у інтактних тварин у всі терміни дослідження (табл. 1).

Таблиця 1. Вплив фулеренів C_{60} на показники інтенсивності оксидативного і нітрооксидативного стресу в сироватці крові і печінці щурів (M±m, n=8)

Показник	Групи тварин				
	Інтактні	C_{60}			
		Час після введення (год)			
		3	6	24	72
	Плазма крові				
NO_x, ммоль/л	3,68 ±0,23	3,12 ±0,21	3,18 ±0,21	3,51±0,15	4,03±0,21
ТБК-АП, мкмоль/л	7,50±0,41	7,10,42	7,88±0,34	7,99±0,37	6,82±0,35
$ОМБ_{370}$, мкмоль/мг білка	0,94±0,04	0,98±0,07	1,16±0,07	1,02±0,06	0,83±0,07
$ОМБ_{430}$, мкмоль/мг білка	0,62±0,03	0,72±0,04	0,74±0,04	0,75±0,05	0,65±0,04
КТ, мкат/л	0,71±0,03	0,63±0,04	0,65±0,04	0,62±0,03	0,7±0,06
ЦП, мг/л	242,1±10,4	226,5±17,2	229,9±16,0	231,7±17,4	234,9±18,2
GSH, ммоль/л	2,90±0,22	2,42±0,19	2,55±0,18	2,63±0,16	2,71±0,19
ЗАА, % гальмування утворення ТБК-АП	53,33±3,09	52,83±2,25	50,50±2,77	50,33±3,61	52,16±3,80
Печінка					
NO синтаза, нмоль/мг білка*хв	3,06±0,38	3,24±0,46	3,96±0,28	3,48±0,20	3,18±0,32
СОД, ум.од/г	0,67±0,02	0,7±0,03	0,61±0,02	0,59±0,03	0,75±0,02

Як свідчать дані таблиці 2, введення щурам 0,5 мл толуолу призводило до достовірного зростання вмісту ТБК-активних продуктів у плазмі крові у всі терміни дослідження з максимумом (237 %) на 6 год після ін'єкції. Толуол також викликав окисну модифікацію як нейтральних, так і лужних амінокислот сироватки крові. Через 3, 6, 24 і 72 год після початку введення токсину вміст у сироватці 2,4-динітрофенілгідразонів, що визначалися при 310 нм (відображає концентрацію альдегідо- і кетонопохідних нейтрального характеру), збільшився відповідно в 1,3, 1,4, 1,4 і 1,3 раза, порівняно зі здоровими щурами, а тих, що визначалися при 430 нм (альдегідо- і кетонопохідні основного характеру), – у 1,5, 1,4, 1,3 і 1,2 раза ($p<0,05$ у всіх випадках).

Таблиця 2. Вплив толуолу на показники інтенсивності оксидативного і нітрооксидативного стресу в сироватці крові і печінці щурів (M±m, n=8)

Показник	Групи тварин				
	Інтактні	Толуол			
		Час після введення (год)			
		3	6	24	72
	Плазма крові				
NO_x, ммоль/л	3,68 ±0,23	7,32±0,48*	6,62±0,34*	5,66±0,37*	4,78±0,28*
ТБК-АП, мкмоль/л	7,50±0,41	13,86±0,78*	17,76±0,93*	16,12±0,74*	14,89±0,82*
$ОМБ_{370}$, мкмоль/мг білка	0,94±0,04	1,20±0,04*	1,36±0,05*	1,28±0,06*	1,19±0,03*
$ОМБ_{430}$, мкмоль/мг білка	0,62±0,03	0,90±0,04*	0,84±0,05*	0,78±0,04*	0,74±0,03*
КТ, мкат/л	0,71±0,03	0,99±0,04*	1,23±0,06*	1,07±0,09*	0,87±0,04*
ЦП, мг/л	242,1±10,4	280,2±8,03*	299,3±10,9*	282,1±8,60*	270,2±8,83
GSH, ммоль/л	2,90±0,22	2,04±0,19*	1,70±0,15*	1,86±0,13*	2,12±0,12*
ЗАА, % гальмування утворення ТБК-АП	53,33±3,09	32,16±2,58*	34,66±2,70*	45,83±2,41	48,50±2,29
Печінка					
NO синтаза, нмоль/мг білка*хв	3,06±0,38	7,95±0,34*	7,67±0,29*	7,03±0,30*	6,44±0,26*
СОД, ум.од/г	0,67±0,02	0,41±0,03*	0,32±0,04*	0,39±0,03*	0,52±0,02*

Примітка. * – зміни достовірні порівняно з контролем ($p<0,05$).

Найбільшою мірою явища оксидативного стресу проявилися в щурів, яким вводили фулерени, розведені в толуолі. В тварин даної групи, порівняно з інтактними щурами, на 6 год експерименту активність процесів ліпопероксидації зростала в 2,9 раза. При цьому через 3, 6 і 24 год вміст ТБК-активних продуктів був достовірно вищим від такого у відповідних групах тварин, яким вводили тільки толуол. Концентрація модифікованих вільними радикалами білків у сироватці крові щурів IV групи також підвищувалася значно різкіше, ніж у тварин III групи (і вміст $ОМБ_{310}$, і рівень $ОМБ_{430}$ при поєднаному застосуванні наночастинок і толуолу був достовірно вищим від такого при застосувані лише хімічного токсину на 3, 6 і 24 год експерименту).

Відомо, що активність процесів ліпопероксидації та окисної модифікації білків залежить не тільки від інтенсивності утворення вільних радикалів у тканинах, а й від функціонального стану системи антиоксидного захисту. З метою дослідження впливу фулеренів і толуолу на стан антиоксидної системи ми визначали активність каталази і супероксиддисмутази, вміст церулоплазміну і відновленого глутатіону та загальну антиоксидну активність плазми крові. Як показали результати наших досліджень, введення тваринам толуолу супроводжувалося глибокими порушеннями антиоксидної системи. Так, через 6 год після введення токсину активність одного з найпотужніших антиоксидних ферментів організму – СОД, – знизилася у печінці в 2,1 раза ($p<0,05$). В інші терміни дослідження зменшення активності даного ферменту також було достовірним. Активність КТ і вміст ЦП, навпаки, достовірно підвищувалися після введення толуолу у всі терміни дослідження. Концентрація ще одного важливого антиоксиданта – GSH – зменшувалася під впливом хімічного токсину в 1,4, 1,7, 1,6 і 1,4 раза, відповідно на 3, 6, 24 і 72 год експерименту. ЗАА плазми крові у щурів III групи зменшувалася достовірно, порівняно з контролем, тільки через 3 і 6 год після введення токсину.

Максимальні зміни показників функціонування антиоксидної системи зафіксовано у тварин, яким вводили толуол разом з карбоновими наночастинками (табл. 3). В цьому випадку активність СОД у печінці і вміст GSH в сироватці крові були достовірно меншими, порівняно з такими ж показниками у відповідні строки у тварин, яким вводили толуол без наночастинок.

Таблиця 3. Вплив поєднаного застосування C_{60} і толуолу на показники інтенсивності оксидативного і нітрооксидативного стресу в сироватці крові і печінці щурів (M±m, n=8)

Показник	Групи тварин				
	Інтактні	Толуол + C_{60}			
		Час після введення (год)			
		3	6	24	72
Плазма крові					
NO_x, ммоль/л	3,68 ±0,23	9,84±0,66*#	8,82±0,48*#	8,01±0,37*#	7,19±0,5*#
ТБК-АП, мкмоль/л	7,50±0,41	17,76±1,05*#	21,82±±1,34*#	20,62±±0,95*#	16.31±±1.27*
$ОМБ_{370}$, мкмоль/мг білка	0,94±0,04	1,37±0,04*#	1,52±0,03*#	1,43±0,04*#	1,24±0,05*
$ОМБ_{430}$, мкмоль/мг білка	0,62±0,03	1,06±0,05*#	0,98±0,02*#	0,86±0,02*#	0,78±0,04*
КТ, мкат/л	0,71±0,03	1,44±0,08*#	1,42±0,13*	1,17±0,07*	1,08±0,06*
ЦП, мг/л	242,1±10,4	313,8±12,5*	314,2±10,4*	295.7±12,8*	282,7±11,8*
GSH, ммоль/л	2,90±0,22	1,40±0,11*#	1,20±0,09*#	1,32±0,08*#	1,44±0,10*#
ЗАА, % гальмування утворення ТБК-АП	53,33±3,09	27,16±1,38*	25,50±2,04*	40,33±2,90*	42,5±1,93*
Печінка					
NO синтаза, нмоль/мг білка*хв	3,06±0,38	9,80±0,32*#	9,48±0,40*#	8,87±0,26*#	7,26±0,38*
СОД, ум.од./г	0,67±0,02	0,30±0,02*#	0,25±0,01*#	0,38±0,03*	0,48±0,04*

Примітка. * – зміни достовірні порівняно з контролем ($p<0,05$); # – зміни достовірні порівняно з групою тварин, яким вводили толуол ($p<0,05$).

Токсичне ураження печінки призводить до формування медіаторів запалення, основними з яких є прозапальні цитокіни, які можуть моделювати систему синтезу оксиду азоту в тканинах, зокрема призводити до гіперактивації індуцибельної форми синтази оксиду азоту. Тому цікаво було дослідити вплив комбінованого застосування фулеренів з толуолом на загальну активність NO-син-

тази у печінці і вміст метаболітів оксиду азоту в крові. Як свідчать наведені в таблиці 2 результати, при введенні толуолу загальна активність NO-синтази в печінці різко (більше, ніж у 2 рази) підвищувалася, порівняно з інтактною групою тварин, у всі терміни дослідження. Ще більшою мірою активність ферменту зростала у тварин, яким толуол вводили разом з фулеренами (у щурів цієї групи загальна активність NO-синтази була достовірно вищою, порівняно з такою у тварин III групи).

Очевидно, активацією NO-синтази можна пояснити отримані нами результати, які свідчать про достовірне збільшення рівня метаболітів оксиду азоту – нітратів і нітритів – у сироватці крові щурів, яким вводили толуол і, особливо, толуол разом з фулеренами. Необхідно відзначити, що у тварин IV групи показники вмісту NO_x були достовірно вищими, ніж у тварин, яким вводили толуол без фуллеренів. Ці дані свідчать про те, що при дії хімічного токсину разом з карбоновими наночастинками індуцибельна форма синтази оксиду азоту індукується більшою мірою, ніж при дії токсину без наночастинок. У цьому контексті можна припустити, що порушення обміну NO, поряд з оксидативним стресом, є однією з ключових ланок у патогенетичних побудовах ураження печінки комбінацією карбонових наночастинок і хімічного токсиканта.

Отже, здатність хімічного токсиканта толуолу викликати оксидативний і нітрооксидативний стрес в печінці і сироватці крові достовірно зростає при його введенні в організм разом з карбоновими наночастинками фулеренами C_{60}. Такий синергізм токсичних ефектів досліджуваних чинників найімовірніше зумовлений здатністю фулеренів абсорбувати на своїй поверхні велику кількість токсинів і сприяти їх транспорту до тканин і клітин, зокрема, в гепатоцити. Можливо також, що фулерени безпосередньо змінюють метаболічні шляхи в клітинах, призводячи до токсифікації ксенобіотиків хімічної природи.

Висновок. Карбонові наночастинки фулерени C_{60} посилюють здатність хімічного токсиканта толуолу викликати оксидативний і нітрооксидативний стрес в сироватці крові і печінці.

Перспективи подальших досліджень. Механізм синергічного ефекту хімічного токсину і наночастинок потребує подальшого дослідження.

ЛІТЕРАТУРА

1. Ellman G. L. Tissne sulfhydryl groups/ G. L. Ellman // Arch of Bioch. and Biophys. – 1959. – № 82. – P. 70–77.

2. Jensen A. W. Biological applications of fullerenes / A. W. Jensen, S. R. Wilson D. I. Schuster // Bioorg. Med. Chem. – 1996. – Vol. 4. – P. 767–779.

3. Oberdorster E. Manufactured nanomaterials (fullerenes, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass / E. Oberdorster // Environ. I Health Perspect. – 2004. – Vol. 112. – P. 1058–1062.

4. Piotrovsky L. B. Fullerenes and viruses / L. B. Piotrovsky, O. I. Kiselev // Fullerenes, nanotubes, and carbon nano- structures. – 2004. – Vol. 12. – P. 397–403.

5. Spectrophotometric method for the direct detection and quantitation of nitric oxide, nitrite, and nitrate in cell culture media / L. Ridnour, J. E. Sim, M. Hayward [et al.] // Anal. Biochem. – 2000. – Vol. 281. – P. 223–229.

6. Assay using brain homogenate for measuring the antioxidant activity of biological fluids / J. Stock, J. M. Gutteridge, R. J. Sharp, I. L. Dormandy // Clin. Sci. and Mol. Med. – 1974. – Vol. 47. – P. 215–222.

7. N-Hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine / D. Stuehr, N. S. Kwon, C. Nathan, O. Griffiths // J. Biol. Chem. – 1991. – Vol. 266. – P. 6259–6263.

8. Андреева Л. И. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой / Л. И. Андреева, Л. А. Кожемякин, А. А. Кишкун // Лаб. дело. – 1988. – № 11. – С. 41–43.

9. Балабанов В. И. Нанотехнологии. Наука будущего / В. И. Балабанов. – М. : Эксмо, 2009. – 220 с.

10. Колб В. Г. Справочник по клинической химии / В. Г. Колб, В. С. Камышников. – Минск : Беларусь, 1982. – 311 с.

11. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова, В. Е. Токарев // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.

12. Мещишен І. Ф. Метод визначення окислювальної модифікації білків плазми (сироватки) крові / І. Ф. Мещишен // Буковинський мед. вісн. – 1998. – 2, № 1. – С. 156–158.

13. Пиотровский Л. Б. Фуллерены в биологии / Л. Б. Пиотровский, О. И. Киселев. – СПб. : Росток, 2006. – 336 с.

14. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологическом материале / С. Чевари, И. Чаба, Й. Секей // Лаб. дело. – 1985. – № 11. – С. 678–681.

15. Чекман І. С. Нанофармакологія: експериментально-клінічний аспект / І. С. Чекман // Лікарська справа. – 2008. – № 3. – С. 104–109.

FULLERENES C_{60} ENHANCE OXIDATIVE AND NITROOXIDATIVE STRESS CAUSED BY TOLUENE

©L. M. Palytsia, S. O. Yastremska, M. M. Korda

SHEI «Ternopil State Medical University by I. Ya. Horbachevsky of MPH of Ukraine»

SUMMARY. Nanoparticles and nanomaterials assume the character of a new global factor, which can be characterized as a potential threat to public health. The aim of this work was to investigate the effect of fullerenes C_{60} on the ability of known chemical toxicant toluene to cause the oxidative and nitrooxisative stress in serum and liver of experimental rats. The animals were injected intraperitoneally with fullerene suspension (60 mg/kg), toluene (0.5 ml/kg) and toluene with dissolved therein fullerenes. In dynamics (3-72 h) in serum and liver the total activity of NO synthase, superoxide dismutase, catalase, contents of NO_x, TBA-active products, oxidative-modified proteins, glutathione, ceruloplasmin and total serum antioxidant activity were determined. The maximal changes of all parameters in all terms of study were registered in the group of animals injected with fullerenes dissolved in toluene. The contents of NO_x, TBA-active products, oxidative-modified proteins, glutathione and superoxide dismutase activity in animals injected with nanoparticles and toxicant were changed significantly compared with animals injected only with toxicant. It has been concluded that fullerenes C_{60} enhance the ability of toluene to cause oxidative and nitrooxidative stress in serum and liver.

KEY WORDS: fullerenes, toluene, oxidative stress and nitrooxidative stress.

Отримано 20.10.2014