6. Extrapolation Escape Task (OpenScience, Moscow, Russia). — http://www.openscience.ru/.
7. *Dubrovskaya N. M.* Role of the striatal cholinergic system in the regulation of learned manipulation in rats / N. M. Dubrovskaya, I. A. Zhuravin // Integrative Physiol. Behav. Sci. — 1995. — V. 30, N. 2. — P. 127–137.

Рецензент: старший науковий співробітник лабораторії живлення птиці, кандидат сільськогосподарських наук Сірко Я. М.

УДК 577.3 + 615.9

СТАН СИСТЕМИ ПРООКСИДАНТИ-АНТИОКСИДАНТИ В НИРКАХ ЩУРІВ, ЯКИМ ВВОДИЛИ АФЛАТОКСИН В1

Р. О. Федяков[1], Г. Л. Антоняк[1, 2], О. М. Стефанишин[1]
[1]Інститут біології тварин НААН
[2]Львівський національний університет імені Івана Франка,

Досліджували стан системи прооксиданти-антиоксиданти в гомогенатах клітин нирки щурів, яким вводили афлатоксин В1. Установлено, що впродовж 21-добового періоду після введення токсину в гомогенатах клітин відбувається нагромадження продуктів пероксидного окиснення ліпідів і змінюється активність ферментів антиоксидантної системи (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза). На 1-шу добу досліджень супероксиддисмутазна і каталазна активність зростає, а глутатіонпероксидазна та глутатіонредуктазна — зменшується. Наприкінці експерименту відбувається пригнічення всіх досліджуваних ферментів-антиоксидантів у зазначених клітинах. Отримані дані свідчить про роль оксидативного стресу в механізмах токсичного впливу афлатоксину В1 на клітини нирок.

Ключові слова: МІКОТОКСИНИ, АФЛАТОКСИН В1, ПЕРОКСИДНЕ ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ, АНТИОКСИДАНТНА СИСТЕМА, НИРКИ

Афлатоксини — це група мікотоксинів, які синтезуються як вторинні метаболіти грибів роду *Aspergillus*. Ці сполуки часто виявляють у кормах тварин, а іноді — у продуктах харчування людини [1, 2]. За умов тривалого надходження в організм афлатоксини зумовлюють сповільнення росту, пригнічення діяльності імунної системи, порушення функцій печінки та нирок, а у високих концентраціях можуть спричиняти загибель сільськогосподарських тварин і птиці [3]. Головним із групи афлатоксинів є афлатоксин В1 (AFB1), який належить до найнебезпечніших природних отрут [4].

Афлатоксини метаболізуються у печінці за участю мікросомальних ферментів із утворенням продуктів різного рівня токсичності, які можуть надходити в кров і виводитись із організму через видільну систему [5]. Неметаболізовані афлатоксини, в тому числі, AFB1 також виявляють у крові. Тому нирки є органом, який зазнає безпосереднього впливу афлатоксинів та їхніх метаболітів. Однак механізми впливу цих токсичних сполук на метаболізм у клітинах нирок з'ясовані недостатньо.

Як відомо, в механізмах дії різноманітних токсикантів важливу роль відіграє здатність стимулювати утворення активних форм Оксигену (АФО) та процеси пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), спричиняючи розвиток оксидативного стресу [6]. За умов зниження активності ферментів антиоксидантної системи надмірне утворення АФО і продуктів ПОЛ призводить до пошкодження біологічних молекул, плазматичних мембран та інших клітинних компонентів, і, як наслідок — порушення метаболізму та функцій клітини [6]. Тому метою роботи було дослідити вплив AFB1 на прооксидантно-

антиоксидантний баланс у клітинах нирки за одноразового парентерального введення токсину в організм тварин.

Матеріали і методи

Експерименти проводили на білих безпородних щурах-самцях масою 170–200 г, яких утримували на стандартному раціоні в умовах віварію. Тварин поділили на 5 груп: контрольну (К) і 4 дослідні (Д1-Д4), по 5 особин у кожній. Щурам дослідних груп одноразово вводили AFB1 в дозі 0,5 мг/кг маси внутрішньочеревинною ін'єкцією та аналізували їх, відповідно, на 1-шу, 7-му, 14-ту і 21-шу доби після введення AFB1. Тваринам контрольної групи вводили фізіологічний розчин в аналогічному об'ємі. Евтаназію здійснювали під легким ефірним наркозом, дотримуючись положення «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях» [7].

Нирки, відібрані відразу ж після евтаназії, охолоджували до температури 1–4°С у фізіологічному розчині, підсушували фільтрувальним папером, а потім подрібнювали ножицями та гомогенізували в 0,05 М тріс-HCl буфері (pH 7,5) з додаванням 0,25 М сахарози. Співвідношення маси тканини до об'єму буферу становило 1:9. Одержані гомогенати центрифугували при 10 000 g впродовж 30 хв, використовуючи для досліджень надосадову рідину.

У гомогенатах визначали концентрацію продуктів, які взаємодіють з тіобарбітуровою кислотою (ТБК-активні продукти) [8], та активність ферментів антиоксидантної системи (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза). Супероксиддисмутазну активність визначали за рівнем гальмування ферментом процесу відновлення нітросинього тетразолію за присутності NADP і феназинметасульфату [9]. Активність глутатіонредуктази визначали, враховуючи швидкість окиснення молекул NADPH [10]. Глутатіонпероксидазну активність досліджували шляхом визначення рівня окиснення глутатіону в присутності гідропероксиду третинного бутилу [10]. Вміст білка в гомогенатах визначали методом Лоурі і співавторів [10]. Отримані результати опрацьовували статистично з використанням методів варіаційної статистики [11].

Результати й обговорення

Як видно з представлених даних (рисунок), після введення тваринам афлатоксину В1 в гомогенатах нирки відбувається збільшення вмісту ТБК-активних продуктів ($P<0,01$-$0,001$), що свідчить про активацію процесів ПОЛ у клітинах зазначеного органу. Збільшення цього показника найвиразніше проявляється на початковій стадії досліджень. Так, через 1 добу після ін'єкції AFB1 концентрація продуктів ПОЛ зростає в 2,4 раза ($P<0,001$). На 7, 14 і 21-шу доби експерименту вміст ТБК-активних продуктів збільшується, відповідно, на 83 %, 94 % і 91% у порівнянні з контролем ($P<0,01–0,001$).

За умов активації процесів ПОЛ важливе значення має функціонування захисних систем, перш за все, антиоксидантної системи клітин. Важливими компонентами цієї системи є ферменти (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза), які каталізують процеси детоксикації реакційно активних метаболітів Оксигену [12]. В процесі досліджень установлено, що за умов гострої інтоксикації афлатоксином В1 динаміка активності ферментів антиоксидантної системи в клітинах нирок піддослідних тварин неоднакова. На 1-шу добу після введення токсину супероксиддисмутазна і каталазна активність зростає ($P<0,05$), а активність глутатіон-залежних ферментів знижується ($P<0,05–0,01$). На наступних стадіях досліджень відбувається зниження активності усіх досліджуваних ферментів-антиоксидантів ($P<0,05–0,001$), за винятком супероксиддисмутази, активність якої на 7-му добу експерименту не відрізняється від контрольних значень, а на 14 і 21-у доби знижується, відповідно, на 37,4% і 34,9% ($P<0,05$).

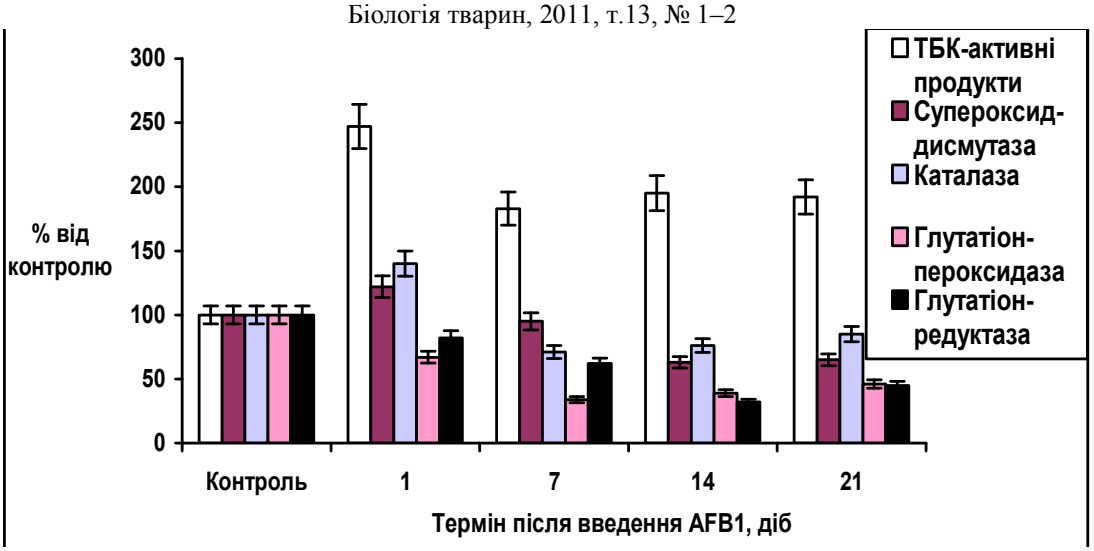

Рис. Динаміка вмісту ТБК-активних продуктів і ферментів антиоксидантної системи в гомогенатах нирки щурів, яким вводили AFB1

Результати досліджень свідчать, що афлатоксин B1 істотно впливає на баланс системи прооксиданти-антиоксиданти в клітинах нирки, як і в інших типах клітин, у тому числі, в гепатоцитах та еритроцитах [13]. Отримані дані дають підставу вважати, що продовж першої доби після ін'єкції AFB1 в клітинах нирки відбувається активація процесів ПОЛ та адаптаційний синтез ферментів антиоксидантної системи — супероксиддисмутази та каталази за одночасного пригнічення глутатіонпероксидази і глутатіонредуктази. Із збільшенням терміну після надходження токсину в організм тварин активність ферментів антиоксидантної системи пригнічується. Вірогідно, такий ефект відбувається внаслідок інгібувального впливу продуктів ПОЛ, пошкодження структури ферментних білків та пригнічення процесів синтезу молекул ферментів продуктами метаболізму AFB1. Дисбаланс у системі прооксиданти-антиоксиданти може бути однією з ланок у механізмах токсичного впливу AFB1 на нирки і призводити до порушень у функціональній активності видільної системи за надходження афлатоксинів в організм тварин і людини.

Одержані результати слугують основою для подальших досліджень механізмів токсичного впливу AFB1 та інших афлатоксинів у клітинах тварин, а також можливості корекції порушень метаболізму в організмі за умов отруєння афлатоксинами.

Висновки

1. Упродовж 21-добового періоду після одноразового парентерального введення афлатоксину B1 (0,5 мг/кг) в гомогенатах клітин нирки щурів збільшується рівень ТБК-активних продуктів, що свідчить про стимулювальний вплив токсину на процеси ПОЛ у клітинах тварин.
2. Упродовж початкового періоду (1-ша доба) після надходження афлатоксину B1 в клітинах нирки щурів відбувається активація супероксиддисмутази і каталази та зниження активності глутатіон-залежних ферментів. На завершальній стадії експерименту (21-а доба після ін'єкції) активність ферментів антиоксидантної системи (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза) в зазначених клітинах пригнічується.

Перспективи подальших досліджень. Провести оцінку впливу афлатоксину B1 на функціонування інших органів та систем у щурів та дослідити можливості корекції його токсичної дії за участю ентеросорбентів та протекторів.

R. O. Fedyakov, H. L. Antonyak, O. M. Stefanyshyn

PROOXIDANT-ANTIOXIDANT SYSTEM STATE IN KIDNEYS OF RATS INJECTED WITH AFLATOXIN B1

S u m m a r y

The lipid peroxidation process and antioxidant system activity were studied in kidneys cells homogenates of rats injected with aflatoxin B1 by single intraperitoneal injection at a dose of 0.5 mg / kg. It was established that within 21-day period after toxin injection accumulation of lipid peroxidation products and changes in activities of antioxidant system enzymes took place. The data indicate a role of oxidative stress in the mechanisms of toxic effects of aflatoxin B1 in kidney cells.

Р. О. Федяков, Г. Л. Антоняк, О. М. Стефанышин

СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ ПРООКСИДАНТЫ-АНТИОКСИДАНТЫ В ПОЧКАХ КРЫС, КОТОРЫМ ВВОДИЛИ АФЛАТОКСИН В1

А н н о т а ц и я

Исследовали состояние системы прооксиданы-антиоксиданты в гомогенатах клеток почки крыс, которым вводили афлатоксин В1 одноразовой внутрибрюшнной инъекцией в дозе 0,5 мг / кг. Установлено, что в течение 21-суточного периода после введения токсина в гомогенатах клеток происходит накопление продуктов перекисного окисления липидов и изменяется активность ферментов антиоксидантной системы (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза). На 1-е сутки исследований супероксиддисмутазная и каталазная активность возрастает, а глутатионпероксидазная и глутатионредуктазная — уменьшается. В конце эксперимента происходит угнетение активности всех исследуемых ферментов-антиоксидантов в исследуемых клетках. Полученные данные указывают на роль оксидативного стресса в механизмах токсического воздействия афлатоксина В1 на клетки почек.

1. *Антоняк Г. Л.* Афлатоксини: Біологічні ефекти та механізми впливу на організм тварин і людини / Г. Л. Антоняк, Н. О. Бабич, О. М. Стефанишин та ін. // Біологія тварин. — 2009. — Т. 11, № 1–2. — С. 16–26.
2. *Wild C. P.* The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions / C. P. Wild, P. C. Turner // Mutagenesis. — 2002. — Vol.17, №.6 — P. 471–481.
3. *Rustemeyer S. M.* Effects of dietary aflatoxin on the health and performance of growing barrows / S. M. Rustemeyer, W. R. Lamberson, D. R. Ledoux et al. // J. Anim. Sci. — 2010. — Vol. 88, N 11. — P. 3624–3630.
4. *Yu J.* Aspergillus flavus genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases / J. Yu, T. E. Cleveland, W. C. Nierman, J. W. Bennett // Rev. Iberoam. Micol. — 2005. — Vol. 22. — P. 194–202.
5. *Obuseh F. A.* Aflatoxin B1 albumin adducts in plasma and aflatoxin M1 in urine are associated with plasma concentrations of vitamins A and E / F. A. Obuseh, P. E. Jolly, Y. Jiang, F. et al. // Int. J. Vitam. Nutr. Res. — 2010. — Vol. 80. — P. 355–368.
6. *Зенти М. К.* Окислювальний стрес. Біохімічні та патофізіологічні аспекти / М. К. Зенти, В. З. Ланкін, Е. Б. Меньщикова. — М. : Наука, 2001. — С. 340.
7. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. — Strasburg : Concil of Europe, 1986. — № 123. — P. 52.
8. *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.
9. *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.
10. *Прохорова М. И.* Методы биохимических исследований / М. И. Прохорова // Л. : Изд-во Ленинградского ун-та, 1982. — 272 с.

11. *Лапач С. Н.* Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. — М. : Морион, 2001. — 408 с.
12. *Halliwell B.* Free radicals and antioxidants: a personal view / B. Halliwell // Nutr. Rev. — 1994. — Vol. 52. — N 8. — P. 253–265.
13. *Yener Z.* Effects of Urtica dioica L. seed on lipid peroxidation, antioxidants and liver pathology in aflatoxin-induced tissue injury in rats / Z.Yener, I. Celik , F. Ilhan, R. Bal // Food Chem Toxicol. — 2009.—. Vol. 47 — P. 418–424.

Рецензент: кандидат біологічних наук**,** завідувач лабораторії біотехнології мікроорганізмів Колісник Г. В.