



О. Я. СКЛЯРОВ

О. Я. Скляров, завідувач кафедри біологічної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (ЛНМУ), доктор медичних наук, професор

Л. П. Білецька, асистент кафедри біологічної хімії ЛНМУ, кандидат біологічних наук

О. П. Хаврона, старший викладач кафедри біологічної хімії ЛНМУ, кандидат біологічних наук

Процеси пероксидного окиснення ліпідів та стан антиоксидантної системи лейкоцитів крові білих щурів при довготривалому введенні катіонів Свинцю

Вступ

Серед численних ксенобіотичних факторів навколишнього середовища значне місце займає Свинець. Цей хімічний елемент інтенсивно використовують у різних галузях промисловості, у зв'язку з чим упродовж останніх десятиріч він є одним з основних забрудників. Це зумовлює збільшення ризику потрапляння Pb^{2+} до організму людини із продуктами харчування, водою та атмосферним повітрям. Результати наукових досліджень свідчать, що за тривалого надходження в організм катіони Pb^{2+} здатні накопичуватися у клітинах тканин, виявляючи кумулятивну токсичність щодо багатьох органів і систем, у тому числі кровотворної та імунної [10, 11].

Відомо, що під впливом високих доз Свинцю пригнічується функціональна активність імунної системи. Зокрема, у працівників промислових підприємств, пов'язаних із використанням цього важкого металу, зменшується вміст Т-і В-лімфоцитів у крові, знижується мітогенна активність Т-лімфоцитів, виявля-

ються генотоксичні ефекти в лімфоцитах. У експериментах на тваринах при введенні Свинцю спостерігалось пригнічення енергетичного метаболізму та антиоксидантного захисту, зниження вмісту нуклеїнових кислот у нейтрофільних гранулоцитах і лімфоцитах [9].

У механізмах токсичної дії Свинцю значну роль відіграє стимуляція процесів утворення активних форм кисню та порушення балансу між вмістом оксидантів та антиоксидантів із подальшим розвитком в організмі оксидативного стресу, в тому числі й лейкоцитах крові, які одними із перших реагують на зміни внутрішнього середовища організму під дією токсиканта [6, 15]. У зв'язку з цим метою роботи було дослідження впливу Pb^{2+} на активність процесів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) та антиоксидантний статус лейкоцитів крові щурів.

Матеріал і методи

Дослідження проводили на безпородних білих лабораторних щурах-самцях масою 160–180 г, яких утримували за

стандартних умов віварію. Експериментальний матеріал отримували після евтаназії, яку здійснювали декапітацією під легким ефірним наркозом за «Загальними принципами роботи на тваринах», затвердженими I Національним конгресом по біоетиці (Київ, 2001).

У процесі експерименту було сформовано 4 групи щурів — інтактні (контрольна — К) і три дослідні (Д1–Д3), по 10 тварин у кожній. Щурам груп Д1–Д3 вводили у шлунок розчин ацетату свинцю щодоби в дозі 3 мг/кг маси (1/30 LD₅₀) упродовж 7, 14 і 28 діб [7].

Із периферичної крові отримували нейтрофільні гранулоцити та лімфоцити. Для виділення лейкоцитів до гепаринізованої крові додавали желатин та інкубували при 37 °С. Після осідання еритроцитів проводили фракціонування лейкоцитів у густині фіколу та верографіну. Фракція клітин, що розміщувалася між плазмою і шаром суміші з питомою густиною 1,077 г/см³, була збагачена лімфоцитами, фракція клітин між шарами суміші з питомою густиною 1,077 і 1,119 г/см³ — гранулоцитами [8]. Цілісність і життєздатність клітин контролювали під мікроскопом та за допомогою реакції з трипановим синім [12].

У лізатах, приготовлених шляхом триразового заморожування — відтаювання водних суспензій клітин, визначали активність ензимів антиоксидантної системи (супероксиддисмутази (СОД), глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази, каталази), вміст ТБК-активних продуктів та гідроперексидів ліпідів. Активність СОД вивчали за рівнем гальмування ферментом процесу відновлення нітросинього тетразолію в присутності NADH і феназинметасульфату [1]; активність глутатіонредуктази — за швидкістю відновлення глутатіону в присутності NADPH [14]; глутатіонпероксидази — за швидкістю окиснення глутатіону в присутності гідроперексиду третинного бутілу [4]; активність каталази — за методом [3]. Вміст ТБК-активних продуктів визначали з використанням тіобарбітурової кислоти [2]; гідроперекиси ліпідів — із тіоціанатом амонію [5]. Результати оброблено за методом варіаційної статистики із застосуванням програмного забезпечення ANOVA з визначенням t-критерію Стьюдента.

Результати дослідження та їх обговорення

Проведені дослідження показали, що тривале надходження до організму тварин катіонів Pb²⁺ у дозі 3 мг/кг маси призводило до активації процесів ПОЛ у лейкоцитах крові. Порівнюючи вміст продуктів ПОЛ в окремих популяціях цих клітин, можна відзначити, що в лімфоцитах перебіг цього процесу був активніший, ніж у нейтрофільних гранулоцитах (табл. 1). Зокрема, в нейтрофілах вміст ТБК-активних продуктів підвищувався в 1,3–1,4 разу (p < 0,01) впродовж періоду від 14-ї до 28-ї доби експерименту в порівнянні з показниками контрольної групи тварин. У лімфоцитах вміст ТБК-активних продуктів зростав в 1,6 разу (p < 0,05) на 7-му добу після початку введення тваринам Pb(CH₃COO)₂, а потім поступово зменшувався, наближаючись до показників контролю на 28-му добу досліджень. Водночас від 14-ї до 28-ї доби введення катіонів Pb²⁺ у лімфоцитах тварин призводило до збільшення вмісту гідроперексидів ліпідів у 1,8–2,5 разу (p < 0,05) (табл. 1).

Збільшення вмісту продуктів ПОЛ супроводжувалося змінами активності ензимів антиоксидантної системи (СОД, глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази, каталази) в лейкоцитах щурів, яким вводили Pb(CH₃COO)₂. Як свідчать результати дослідження, у період від 7-ї до 14-ї доби експерименту в нейтрофільних гранулоцитах тварин пригнічувалась активність СОД в 1,4 і 1,6 разу (p < 0,05), що супроводжувалося зменшенням активності глутатіонпероксидази на 14-ту добу в 1,2 разу (p < 0,05), а глутатіонредуктази — на 7-му і 14-ту доби експерименту, відповідно, в 1,4 і 2,5 разу (p < 0,05), відносно контролю (табл. 2, рис. 1). У нейтрофільних гранулоцитах активність каталази змінювалася хвилеподібно — зростала на 14-ту добу, а наприкінці досліджень знижувалася в 1,6 разу (p < 0,05) (рис. 2).

Для змін активності ензимів системи антиоксидантного захисту в лімфоцитах тварин, яким вводили Pb(CH₃COO)₂, характерні певні відмінності порівняно з нейтрофільними гранулоцитами. Так, незважаючи на подібну картину щодо змін рівня активності СОД, ензими другої ланки антиоксидантного

Таблиця 1

Вміст продуктів ПОЛ у лейкоцитах щурів, яким вводили $Pb(CH_3COO)_2$ (нмоль/ 10^7 клітин $M \pm m$, $n=10$)

Показник	Контроль	Введення $Pb(CH_3COO)_2$, доба		
		7-ма	14-та	28-ма
Нейтрофільні гранулоцити				
ТБК-активні продукти	85,19±5,12	102,30±7,21	122,04±5,68**	112,05±6,30*
Лімфоцити				
ТБК-активні продукти	93,65±6,70	149,8±10,82*	120,80±8,16*	89,90±6,25
Гідропероксида ліпідів	0,073±0,005	0,096±0,014	0,134±0,012**	0,180±0,014*

Примітка: вірогідність різниць у показниках між контрольною і дослідною групами тварин. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Таблиця 2

Активність ензимів антиоксидантної системи в нейтрофільних гранулоцитах щурів, яким вводили $Pb(CH_3COO)_2$ ($M \pm m$, $n=10$)

Показник	Контроль	Введення $Pb(CH_3COO)_2$, доба		
		7-ма	14-та	28-ма
СОД, ум. од./хв на 1 мг білка	1,50±0,11	1,08±0,06*	0,95±0,08*	1,46±0,09
Каталаза, нг H_2O_2 /хв × 1 мг білка	21,45±1,40	23,95±1,85	27,24±1,62*	13,75±0,50*
Глутатіонпероксидаза, нмоль глутатіону/хв на 1 мг білка	68,97±3,28	63,22±4,20	56,47±2,60*	82,76±6,53
Глутатіонредуктаза, нмоль NADPH/хв на 1 мг білка	6,82±0,38	4,91±0,22*	2,69±0,18*	5,27±0,40*

Примітка: * $p < 0,05$.

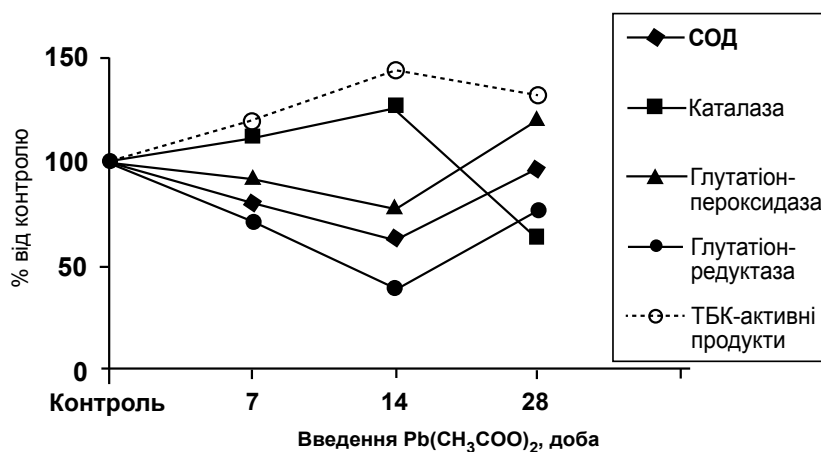


Рис. 1. Активність ензимів антиоксидантної системи та вміст ТБК-активних продуктів у нейтрофільних гранулоцитах щурів, яким вводили $Pb(CH_3COO)_2$

захисту у лізаті лімфоцитів змінювалися по-іншому, а саме: активність глутатіонпероксидази зростала впродовж усього експерименту, тоді як активність глутатіонредуктази збільшувалася на 7-му і 14-ту добу введення тваринам катіонів Pb^{2+} , відповідно, в 1,8 і 1,6 разу ($p < 0,05$). При цьому слід зазначити, що зростання активності глутатіонпероксидази в лімфоцитах супроводжувалося збільшенням

концентрації гідропероксидів ліпідів, які є субстратами цього ензиму. Істотно змінювалася і активність каталази, яка підвищувалася в 2,8 разу ($p < 0,05$) на 7-му добу досліджень і в 1,9 разу ($p < 0,05$) на 14-ту добу введення токсиканта (табл. 3, рис. 2).

Отже, тривале надходження до організму тварин катіонів Свинцю призводило до активації процесів ПОЛ у лейкоцитах

Таблиця 3

Активність ензимів антиоксидантної системи в лімфоцитах щурів,
яким вводили ацетат свинцю ($M \pm m$, $n=10$)

Показник	Контроль	Введення $Pb(CH_3COO)_2$, доба		
		7-ма	14-та	28-ма
СОД (ум. од./хв на 1 мг білка)	1,29±0,07	0,65±0,05*	0,89±0,062*	1,20±0,09
Каталаза (нг H_2O_2 /хв × 1 мг білка)	16,30±1,12	45,31±3,61*	31,0±2,10*	18,25±1,34
Глутатіонпероксидаза, нмоль глутатіону/хв на 1 мг білка	126,8±6,76	224,00±14,71*	200,3±16,2*	163,5±11,80*
Глутатіонредуктаза, нмоль NADPH/хв на 1 мг білка	4,96±0,32	5,72±0,48	6,51±0,44*	3,87±0,36

Примітка: * $p < 0,05$.

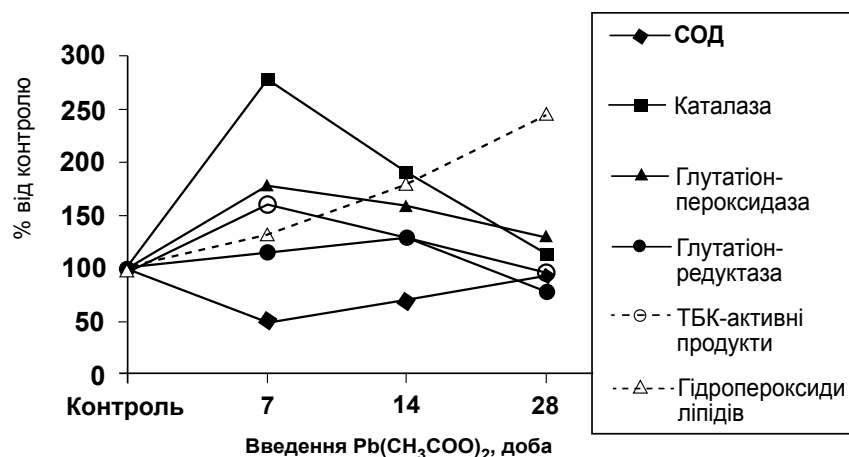


Рис. 2. Активність ензимів антиоксидантної системи і вміст продуктів ПОЛ у лімфоцитах щурів, яким вводили $Pb(CH_3COO)_2$

крові. Це виявлялося у збільшенні вмісту ТБК-активних продуктів у нейтрофільних гранулоцитах у період від 14-ї до 28-ї доби експерименту, лімфоцитах — на 7-му добу досліджень. Крім того, від 14-ї до 28-ї доби введення Pb^{2+} у лімфоцитах тварин збільшувався вміст гідропероксидів ліпідів.

Що стосується зміни активності ензимів антиоксидантної системи лейкоцитів на надходження до організму катіонів Свинцю, то від 7-ї до 14-ї доби експерименту активність СОД пригнічувалась як у нейтрофільних гранулоцитах, так і лімфоцитах крові щурів. Активність каталази змінювалась однонаправлено в обох досліджуваних популяціях лейкоцитів, виявляючи тенденцію до зростання від 7-ї до 14-ї доби і різкого інгібування на 28-му добу введення катіонів Свинцю. Виявлено різну динаміку активності ензимів — глутатіонпероксидази і глутатіонредуктази: у нейтрофільних гра-

нулоцитах вона пригнічувалась, а в лімфоцитах — зростала.

Отримані результати можуть бути пов'язані з тим, що за впливу катіонів Свинцю активність NADPH-оксидази збільшується, внаслідок чого у нейтрофільних гранулоцитах відбувається гіперпродукція супероксидного радикала [13]. Виявлена інтенсифікація процесів ПОЛ у нейтрофільних гранулоцитах за впливу Свинцю призводить до швидкого виснаження резервів системи антиоксидантного захисту клітин, зокрема, зниження активності СОД, глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази, каталази. Лімфоцити за умов тривалого надходження катіонів Свинцю, вірогідно, активують внутрішньоклітинні адаптаційні системи, пов'язані з процесами синтезу металотіонеїнів, що сприяє збільшенню активності ензимів, які каталізують процес детоксикації утвореного в СОД гідро-

гену пероксиду (глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза, каталаза) [16].

Висновки

Тривале введення Свинцю у дозі 3 мг/кг маси призводило до активації процесів ПОЛ у нейтрофільних гранулоцитах і лімфоцитах крові тварин, при цьому активність СОД в обох досліджуваних популяціях лейкоцитів знижувалася, в

той час як активність каталази однонаправлено зростала на 7-му та 14-ту добу і знижувалася на 28-му добу введення $Pb(CH_3COO)_2$.

Глутатіонпероксидазна та глутатіонредуктазна активність характеризувалася тенденцією до зростання в лімфоцитах упродовж експерименту та зниженням активності на 7-му та 14-ту добу дослідження в нейтрофільних гранулоцитах.

Список літератури

1. 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.
2. Коробейников Е. Н. Модификация определения ПОЛ в реакции с ТБК / Е. Н. Коробейников // Лаб. дело. — 1989. — № 7. — С. 8–9.
3. Королюк М. А. Метод определения активности каталазы / [М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова, В. Е. Токарев] // Лаб. дело. — 1988. — № 1. — С. 16–18.
4. Моин В. М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах / В. М. Моин // Лаб. дело. — 1986. — № 12. — С. 724–727.
5. Орехович В. Н. Современные методы в биохимии / В. Н. Орехович. — М.: Медицина, 1977. — 391 с.
6. Першин О. І. Вплив іонів свинцю на пероксидну окисацію ліпідів та активність ферментів антиоксидантної системи в еритроцитах щурів / О. І. Першин, Г. Л. Антоняк // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. — 2005. — № 3 (31). — С. 19–24.
7. Трахтенберг И. М. Тяжелые металлы во внешней среде: современные гигиенические и токсикологические аспекты / И. М. Трахтенберг, В. С. Колесников, В. П. Луковенко. — Минск: Наука и техника, 1994. — 164 с.
8. Boyum A. A. A one-stage procedure for isolation of granulocytes and lymphocytes from human blood / A. A. Boyum // Scand. J. Clin. Lab. Invest. — 1968. — Vol. 21, Suppl., 97. — P. 51–76.
9. Level of DNA damage in lead-exposed workers / E. Olewińska, A. Kasperczyk, L. Kapka, A. Kozłowska, A. Pawlas [et al.] // Ann. Agric. Environ. Med. — 2010. — Vol. 17, N 2. — P. 231–236.
10. Linkage study of cancer risk among lead-exposed workers in New Jersey / T. V. Lam, P. Agovino, X. Niu, L. Roche [et al.] // Sci. Total Environ. — 2007. — Vol. 372, № 2–3. — P. 455–462.
11. Marchetti C. Molecular targets of lead in brain neurotoxicity / C. Marchetti // Neurotox. Res. — 2003. — Vol. 5, N 3. — P. 221–236.
12. Mishell B. B. Selected Methods in Cellular Immunology / B. B. Mishell, S. M. Shiigi. — San Francisco: W. H. Freeman and Company, 1980. — 486 p.
13. NADPH oxidase and ERK1/2 are involved in cadmium induced-STAT3 activation in HepG2 cells / V. Souza, C. Escobar, L. Bucio [et al.] // Toxicol. Lett. — 2009. — Vol. 187, N 3. — P. 180–186.
14. Pinto R. E. The effect of age and sex on glutathione reductase and glutathione peroxidase activities and on aerobic glutathione oxidation in rat liver homogenates / R. E. Pinto, W. Bartley // Biochem. J. — 1969. — Vol. 112, № 1. — P. 109–115.
15. Valko M. Metals, toxicity and oxidative stress / M. Valko, H. Morris, M.T. Cronin // Curr. Med. Chem. — 2005. — Vol. 12, № 10. — P. 1161–1208.
16. Wamelink M. M. The biochemistry, metabolism and inherited defects of the pentose phosphate pathway: a review / M. M. Wamelink, E. A. Struys, C. Jakobs // J. Inher. Metab. Dis. — 2008. — Vol. 31, № 6. — P. 703–717.

Резюме

Summary

Процеси пероксидного окиснення ліпідів та стан антиоксидантної системи лейкоцитів крові білих щурів при довготривалому введенні катіонів Свинцю

О. Я. Скляр, Л. П. Білецька, О. П. Хаврона

У статті подано результати досліджень впливу катіонів Свинцю (за умов тривалого введення у формі $Pb(CH_3COO)_2$ у дозі 3 мг/кг маси) на інтенсивність процесів пероксидного окиснення ліпідів та стан антиоксидантної системи в лейкоцитах білих щурів. Установлено, що протягом 28-добового експериментального періоду під впливом катіонів Свинцю істотно збільшувалася концентрація кінцевих ТБК-активних продуктів пероксидного окиснення ліпідів у лімфоцитах і нейтрофільних гранулоцитах тварин. Активність ферментів-антиоксидантів у лейкоцитах змінювалася неоднозначно, а саме: глутатіонпероксидазна і глутатіонредуктазна в лімфоцитах зростала, а в нейтрофільних гранулоцитах пригнічувалася, тоді як активність супероксиддисмутази знижувалася в обох типах клітин.

Ключові слова: важкі метали, Свинець, лейкоцити, лімфоцити, нейтрофільні гранулоцити, антиоксидантна система.

The Processes of Lipid Peroxidation and State of Antioxidant System in the Leukocytes of Albino Rats with Long-term Administration of Lead Cations

O. Ya. Skliarov, L. P. Biletska, O. P. Khavrona

The results of studies of the effect of lead cation (in conditions of prolonged administration of $Pb(CH_3COO)_2$ in the doze of 3 mg/kg) on the intensity of lipid peroxidation processes and state of antioxidant system in leukocytes of albino rats are presented. It is established that in the 28-day trial period, significantly increased the concentration of the end TBA-active products of lipid peroxidation in lymphocytes and neutrophilic granulocytes of animals. Antioxidant enzyme activity in leukocytes varied ambiguously, namely: glutathione peroxidase and glutathione reductase activities increased in lymphocytes, but in neutrophilic granulocytes was inhibited, whereas the SOD activity decreased in both cell types.

Key words: heavy metals, lead, white blood cells, lymphocytes, neutrophilic granulocytes, antioxidant system.

Процессы пероксидного окисления липидов и состояние антиоксидантной системы в лейкоцитах крови белых крыс при длительном введении катионов Свинца

Ф. Я. Скляр, Л. П. Билецкая, О. П. Хаврона

В статье представлены результаты исследований влияния катионов Свинца (в условиях длительного введения в форме $Pb(CH_3COO)_2$ в дозе 3 мг/кг массы) на интенсивность процессов пероксидного окисления липидов и состояние антиоксидантной системы в лейкоцитах белых крыс. Установлено, что на протяжении 28-суточного экспериментального периода существенно увеличивалась концентрация конечных ТБК-активных продуктов пероксидного окисления липидов в лимфоцитах и нейтрофильных гранулоцитах животных. Активность ферментов-антиоксидантов в лейкоцитах изменялась неоднозначно, а именно: глутатионпероксидазная и глутатионредуктазная в лимфоцитах увеличивалась, а в нейтрофильных гранулоцитах подавлялась, в то время как активность супероксиддисмутазы снижалась в обоих типах клеток.

Ключевые слова: тяжелые металлы, Свинец, лейкоциты, лимфоциты, нейтрофильные гранулоциты, антиоксидантная система.