

УДК 546.48; 577.12; 616.89.008.1.577

**СТАН МЕТАЛОЛІГАНДНОГО ГОМЕОСТАЗУ ТВАРИН ЗА  
ДІЇ ХРОМУ (VI) І ЗАСТОСУВАННІ «ЦИНКТЕРАЛА»  
ТА «АЦЕТИЛЦИСТЕЇНУ»**

***Ю.В. Єщенко, В.Д. Бовт, М.Д. Романова***  
***Запорізький національний університет***  
*vd.bovt@gmail.com*

Исследовано состояние металлолигандного гомеостаза на примере содержания хелатообразующих Zn и Cu, а также содержащих их ферментов, участвующих в оксидативных процессах в крови животных (крыс) при воздействии хрома (VI) и введении антиоксидантов («Цинктерала» и «Ацетилцистеина»). Выявлено, что влияние хрома (VI) изменяет прооксидантно-антиоксидантное состояние клеток, вызывает накопление продуктов ПОЛ, изменяет содержание хелатообразующих Zn и Cu и содержащих их ферментов в крови крыс, а также изменения активности антиоксидантной системы. При введении крысам антиоксидантов (препарата Zn-цинктерала и нетоксичного хелатора ацетилцистеина) на фоне поступления в организм хрома (VI) уменьшалось содержание продуктов ПОЛ, частично нормализовалось содержание хелатообразующих Zn и Cu, а также ферментов содержащих эти металлы в крови животных, повышался антиоксидантный статус клеток.

*Хелатообразующие Zn и Cr, металлолигандный гомеостаз, хром (VI), антиоксидантная система, антиоксиданты.*

Стан здоров'я людини і тварин є одним з основних критеріїв якості навколишнього середовища [1, 4, 6, 7]. Сучасні масштаби екологічних змін створили реальну загрозу життю та здоров'ю громадян України [3, 4, 9, 12]. У структурі загальної захворюваності населення дедалі більшою стає частка хвороб, які, у значній мірі, є наслідком техногенного забруднення довкілля [1, 4, 6, 7]. Антропогенне забруднення природного середовища багато в чому пов'язано з важкими металами [3, 4, 9, 12], але механізми їх розвитку через зміни стану металолігандного гомеостазу досить мало вивчені.

Хром (Cr) – перехідний метал, який у шестивалентному стані Cr (VI) виявляє токсичні мутагенні та канцерогенні властивості [2, 11]. Розповсюдження його сполук у компонентах природного середовища внаслідок антропогенної діяльності може викликати захворювання внаслідок хронічного отруєння цим компонентом [1, 2, 11].

Відомо, що токсичність Cr (VI) опосередковується утворенням активних форм кисню під час його відновлення до Cr (III) [2, 11]. Однак специфіка впливу Cr (VI) на прооксидантно-антиоксидантний стан клітин з'ясовано недостатньою мірою. Тому актуально дослідження метаболічних змін та змін показників металолігандного гомеостазу у тварин, зумовлених надходженням Cr (VI), і з'ясування можливості корекції порушень застосовуванням антиоксидантів.

Виходячи із того, що хелатоутворюючі Zn та Cr є важливими компонентами ферментів, які працюють у прооксидантній та антиоксидантній системі [4, 9, 10, 13], та відіграють значну роль у функціонуванні хелатофільної клітинної системи [1, 5–7, 12] механізми роботи якої ще не з'ясовані, дуже актуально було дослідити зміни кількості цих металів та ферментів, що їх містять, та показників системи організму тварин під впливом Cr (VI). Також доцільно дослідити, які антиоксиданти найбільш підходять для корегування порушень, що виникли.

### Матеріали та методи досліджень

Дослідження проводили згідно плану тем «Стрес і клітинний метаболізм металів» (№ державної реєстрації 0103U000723), «Розробка та обґрунтування методів оцінки функціонального стану клітин за допомогою хелаторів-хромофорів» (№ державної реєстрації 0106U9008392).

Дослідження проводили з використанням 40 безпородних білих щурів-самців масою 150–180 г. Досліди та евтаназію тварин здійснювали з дотриманням вимог «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують для експериментальних і наукових цілей» (Страсбург 1986), та загально етичних принципів експериментів на тваринах, схвалених на Національному конгресі з біоетики (Київ, 2001).

Тварини були поділені на чотири групи: контрольну (I) і три дослідні (II–IV), у кожній групі  $n=10$ . Усім щурам експериментальних груп щодоби протягом 14 діб вводили у шлунок Cr (VI) дозою 5 мг/кг живої маси на добу у вигляді  $K_2Cr_2O_7$ , а щурам контрольної групи – фізіологічний розчин за подібною схемою. Тваринам I-ї групи більше нічого не вводили, тваринами II-ї групи вводили офіційний препарат «Цинктерал» дозою 5 мг/кг, III-ї групі вводили офіційний препарат «Ацетилцистеїн» дозою 5 мг/кг [1, 9].

Як дослідний матеріал використовували кров, що отримали під час декапітації. Нейтрофільні гранулоцити виділяли центрифугуванням (3000 д, 15 хв) у градієнті густини сумішей фіколу та верографіну [2, 3]. Лізис лейкоцитів здійснювали додаванням 2,5 ммоль фосфатного буферу (рН 7,5), з подальшим триразовим заморожуванням-відтаюванням суспензії клітин. Лізати центрифугували при 15 000 д упродовж 30 хв.

Концентрацію продуктів ПОЛ (ТБК-активні продукти) визначали в реакції з 2-тіобарбітуровою кислотою (ТБК) за методом Е.Н. Коробейникова, активність супероксидизмутази (СОД) та каталази здійснювали хемолюмінісцентним методом [2, 3, 10, 11, 13], активність ензимів перераховували на 1 г білка. Вміст білка визначали методом О.Н. Lovegu [2, 3].

Вміст Zn і Cu визначали в гранулоцитах крові за допомогою цитохімічних реакцій з використанням дитизону для Zn [1, 6, 7, 10] і дитиоксаміду для Cu [1]. Вміст металів визначали за

забарвленням гранул та цитоплазми гранулоцитів дитизона – червоним, дитиоксаміда – темно-зеленим. Вміст металів оцінювали напівкількісним методом за Хейхоу та Квагліно [3, 14, 15].

Статистичний аналіз результатів проводили розраховуючи критерій Стюдента з використанням стандартних комп'ютерних програм.

### Результати та їх обговорення

Враховуючи, що оксидантно-антиоксидантний статус клітин залежить від функціонування металомістких ферментів, а останнє, в свою чергу, – від вмісту хелатоутворюючих форм цих металів у крові, необхідно було дослідити, як змінювався вміст Zn і Cu в гранулоцитах крові за впливу на організм Cr (VI), та при наступному введенні антиоксидантів, що наведено у таблиці 1.

Таблиця 1 – Вміст Zn та Cu в гранулоцитах крові щурів у нормі (I) при введенні Cr (VI) (II) та його сполученні с «Цинктералом» (III) і «Ацетилцистеїном» (IV) (n=10)

Table 1 – Content of Zn and Cu in rat's blood granulocytes normally (I) with the introduction of Cr (VI) (II) and its combination with «Tsynkteralom» (III) and «Acetylcysteine» (IV) (n=10)

Вміст у гранулоцитах	Група тварин	I	II	III	IV
		$M \pm m\bar{x}$	$M \pm m\bar{x}$	$M \pm m\bar{x}$	$M \pm m\bar{x}$
Zn; ум. од.		0,92±0,04	0,63±0,07**	0,87±0,02*	0,74±0,05*
Cu; ум. од.		0,83±0,05	1,32±0,06*	0,99±0,03*	1,03±0,07***

Примітка: \* –  $p < 0,1$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$  в порівнянні з контролем

Введення Cr (VI) викликало в гранулоцитах крові щурів зниження вмісту Zn і підвищення Cu. Введення антиоксидантів підвищувало вміст Zn і знижувало кількість Cu порівняно з введенням Cr (VI), але «Цинктерал» суттєвіше змінював обидва показника, ніж «Ацетилцистеїн», що можливо пояснити

неопосередкованою дією цього препарату на вміст Zn і антагонізмом Zn і Cu [1]. Але обидва препарати не зовсім були спроможні повернути ці показники в норму, в порівнянні з контролем. Аналіз стану оксидантно-антиоксидантної системи при введенні Cr (VI) та його сполученні з введенням «Цинктералу» та «Ацетилцистеїну» наведені у таблиці 2.

Введення Cr (VI) викликало підвищення вмісту ТБК-активних продуктів на 60 % ( $p < 0,05$ ), підвищення активності СОД на 40 % і зниження каталазної активності на 33 % ( $p < 0,01$ ). При уведенні антиоксидантів усі показники змінювались: вміст ТБК і СОД-активність знижувалась, а каталазна активність підвищувалась. Але, «Цинктерал» змінював показники інтенсивніше, ніж «Ацетилцистеїн». Це свідчить, що в даному випадку «Цинктерал» є кращим засобом корегування порушень в оксидантно-антиоксидантній системі захисту клітин.

Таблиця 2 – Вміст ТБК-активних продуктів, супероксидисмутазна активність та каталазна активність у контрольній групі (I), введення калію дихромату (II), та сполучення його з «Цинктералом» (III) і «Ацетилцистеїном» (IV)

Table 2 – Content of TBA-active products, superoxide dismutase and catalase activity in the control group (I) introduction of potassium dichromate (II), and pairing it with «Tsynkteralom» (III) and «Acetylcysteine» (IV)

Показники	Група тварин		I	II	III	IV
			$M \pm m \bar{x}$	$M \pm m \bar{x}$	$M \pm m \bar{x}$	$M \pm m \bar{x}$
Вміст ТБК-активних продуктів, ммоль/г тканини			4,37±0,21	13,25±0,80***	8,92±0,33**	9,25±0,25**
Супероксидисмутазна активність, нг/г білка			220,21±18,72	308,85±12,45*	256,3±13,56*	273,41±11,32*
Каталазна активність, ммоль/нг/мг білка			2,36±0,05	1,54±0,03*	1,91±0,03	1,74±0,61

Примітка: \*–  $p < 0,05$ , \*\*–  $p < 0,01$ , \*\*\*–  $p < 0,001$

У подальшому перспективним є дослідження впливу антиоксидантів на стан оксидантно-антиоксидантної системи та металолігандного гомеостазу у працівників на виробництвах, пов'язаних з токсичними металами та їх вплив на репродуктивну функцію.

### Висновки

1. Вплив Cr (VI) збільшує кількість продуктів ПОЛ і змінює активність антиоксидантних металомістких ферментів супероксидимутази і каталази.

2. Антиоксиданти частково можуть нормалізувати усі ці показники.

3. У якості антиоксиданта та корегувальної речовини «Цинктерал» більш ефективний, ніж «Ацетилцистеїн» в випадку впливу Cr (VI).

### Література:

1. *Адаптація та металолігандний гомеостаз / Омелянчик Л.О., Єщенко Ю.В., Кучковський О.М., Бовт В.Д. [монографія] // Запоріжжя, ЗНУ. – 2013. – 352 с.*

*Adaptatsiya ta metaloligandniy gomeostaz / Omelyanchik L.O., Eschenko Yu.V., Kuchkovskiy O.M., Bovt V.D. [monografiya] // Zaporizhzhya, ZNU. – 2013. – 352 s.*

2. *Антоняк Г.Л. Вплив шестивалентного хрому на активність ензимів гліколізу та пентозофосфатного шляху в лейкоцитах крові кроликів / Г.Л. Антоняк, Н.П. Хоміч // Біологія тварин. – 2014. – Т. 16, № 1. – С. 21–28.*

*Antonyak G.L. Vpliv shestivalentnogo hromu na aktivnist enzimiv glykolizu ta pentozofosfatnogo shlyahu v leykotsitah krovi krolikiv / G.L. Antonyak, N.P. HomIch // Biologiya tvarin. – 2014. – T. 16, № 1. – S. 21–28.*

3. *Биоэлементы и допозологическая диагностика / Боев В.М., Быстрых В.В., Верещагин Н.Н. и др. // Микроэлементы в медицине. – 2004. – Т. 5, вып. 4. – С. 17–20.*

*Bioelementy i dopozologicheskaya diagnostika / Boev V.M., Byistryih V.V., Vereschagin N.N. i dr. // Mikroelementy v meditsine. – 2004. – T. 5, vyip. 4. – S. 17–20.*

4. Гончарук Є.Г. Вільнорадикальне окислення як універсальний неспецифічний механізм пошкоджуючої дії шкідливих чинників довкілля / Є.Г. Гончарук, М.М. Кортун // Журнал АМН України. – 2004. – Т. 10, №1. – С. 131–150.

*Goncharuk E.G. Vilnoradikalne okislennya yak universalniy nespetsifichniy mehanizm poshkodzhuyuchoyi diyi shkidlivih chinnikiv dovkillya / E.G. Goncharuk, M.M. Kortun // Zhurnal AMN Ukrayini. – 2004. – T. 10, № 1. – S. 131–150.*

5. Єщенко Ю.В. Вміст металів у хелатофільних клітинах / Єщенко Ю.В., Бовт В.Д., Єщенко В.А. // Науковий часопис КПУ. – 2008. – №1. – С. 53–58.

*Eschenko Yu.V. Vmist metaliv u helatofilnih klitinah / Eschenko Yu.V., Bovt V.D., Eschenko V.A. // Naukoviy chasopis KPU. – 2008. – № 1. – S. 53–58.*

6. Єщенко Ю.В. Порівняльні дослідження цинку в клітинах при дії екстремальних факторів / Ю.В. Єщенко // Фізіологічний журнал. – 2009. – Т. 55, № 5. – С. 72–78.

*Eschenko Yu.V. Porivnyalni doslidzhennya tsinku v klitinah pri diyi ekstremalnih faktoriv / Yu.V. Eschenko // Fiziologichniy zhurnal. – 2009. – T. 55, № 5. – S. 72–78.*

7. Єщенко Ю.В. Стан повітряного басейну Запорізької області та вміст цинку в гранулоцитах крові людей, які мешкають на території з високим рівнем техногенного навантаження / Єщенко Ю.В., Бовт В.Д., Ващенко О.В., Єщенко В.А. // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. – 2007. – Вип. 45. – С. 109–114.

*Eschenko Yu.V. Stan povitryanogo baseynu Zaporizkoyi oblasti ta vmist tsinku v granulotsitah krovi lyudey, yaki meshkayut na teritoriyi z visokim rivnem tehnogennogo navantazhennya / Eschenko Yu.V., Bovt V.D., Vaschenko O.V., Eschenko V.A. // Visnik Lvivskogo universitetu. Seriya biologichna. – 2007. – Vip. 45. – S. 109–114.*

8. Конопський О.І. Біохімія тварин: Підручник 2-е вид., переробл. і допов. – К.: Вища шк., 2006. – 454 с.

*Konopskiy O.I. Biohimiya tvarin: Pidruchnik 2-e vid., pererobl. i dorov. – K.: Vischa shk., 2006. – 454 s.*

9. Пошук біологічно активних сполук на основі S-гетерілзаміщених похідних L-цістеїну та його аналогів / Омелянчик Л.О., Петруша Ю.Ю., Завгородній М.П., Генчева В.І.

// XXII Укр. конф. з органічної хімії тези доповідей (Ужгород, 20–25 вересня 2010 р.). – Ужгород, 2010. – С. 365.

*Poshuk biologicchno aktivnih spoluk na osnovi S-geterilzamischenih pohidnih L-tsisisteyinu ta yogo analogiv / Omelyanchik L.O., Petrusha Yu.Yu., Zavgorodniy M.P., Gencheva V.I. // ННІІ Укр. конф. з органічної хімії тези доповідей (Ужгород, 20–25 вересня 2010 р.). – Ужгород, 2010. – С. 365.*

10. Чеснокова Н.П. *Общая характеристика источников образования свободных радикалов и антиоксидантных систем / Чеснокова Н.П., Попукалипа Е.В., Бизенкова М.Н. // Успехи современного естествознания – 2006. – № 7. – С. 37–41.*

*Chesnokova N.P. Obschaya harakteristika istochnikov obrazovaniya svobodnyih radikalov i antioksidantnyih sistem / Chesnokova N.P., Popukalipa E.V., Bizenkova M.N. // Uspеhi sovremennogo estestvoznaniya – 2006. – № 7. – S. 37–41.*

11. *Bonde J.P. Chromium in biological samples from low-level exposed stainless steel and mild steel welders / J.P. Bonde, J.M. Cristensen // Arch. Environ. Health – 1991. – Vol. 46. – P. 225–229.*

12. *Bovt V.D. Zinc content in blood granulocytes of persons exposed to hydrogen sulphide and toxic metals / V.D. Bovt, J.V. Eshenko // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2012. – № 1 – С. 102–106.*

13. *Bray T.M. The physiological role of Zinc as an antioxidant. Free Radic, / T.M. Bray, W.J. Betger // Biol. Med. 1990. – V. 8. – P. 281–291.*

14. *Hayhoe F. Hematological Lytochemistry / F. Hayhoe, D. Quagliano. – Edinburyh.–London. New-York. Chuchill Lingstone, 1980. – 320 p.*

15. *Pelmenschikov V. Copper – Zinc superoxide dismutase: theoretical insights into the catalytic mechanism / V. Pelmenschikov, P.E. Siegborn // Znorg. Chem. – 2005. – V. 44, № 9. – P. 3311–3320.*



**STATUS OF METALLIGAND HOMEOSTASIS IN ANIMALS  
UNDER INFLUENCE OF CHROMIUM (VI) AND USING**

**«ZINCTERAL» AND «ACETYLCISTEIN»**

***J.V. Eshchenko, V.D. Bovt, M.D. Romanova***

***Zaporizhya National University***

*vd.bovt@gmail.com*

Chelatable metals (Zn, Cu) are essential for the activity for a number of enzymes and also support the integral structure and functionary of biomembranes. There is a possibility that toxic agents can affect enzyme activity and membrane permeability of cells through alteration of chelatable metals status. Toxic metals can be assigned to this group of agents. Several diseases are known to be connected with chelatable metals deficiency e.g. skin lesions, diabetes, retardation of growth and development, and condition of depression. It may be a cause of immunodeficiency, which promotes the development of colds, tumor and other pathological states.

This research focuses on clarifying the biochemical mechanisms of influence of toxic metal (Cr (VI)) on metal–ligand homeostasis in the granulocytes of animal (rats) and antioxidant system in these cells and the correction of metabolic disorders by using the antioxidants – “Zincteral” and “Acetylcystein”.

Usual biochemical methods were used in order to estimate chelatable metals and antioxidant status of granulocytes of animals. The methods are relatively complicated and require great quantities of blood samples. The cytochemical methods used here are simple and need relatively small amounts of blood.

Metals content in blood granulocytes was evaluated with semi-quantitative methods.

It is established that Cr (VI) affects a prooxidant-antioxidant status of the cells causing the changes in antioxidant system activity in the leucocytes of animals.

It is established that Cr (VI) affects a metal–ligand homeostasis status of the cells causing the increasing of Cu and decreasing of Zn in granulocytes of blood and content of metabolic ferment in these cells.

The administration of antioxidant («Zincteral» and «Acetylcystein») simultaneously with Cr (VI) intake reduces the content of lipid peroxidation products, improves hair quality compared with those established in animals exposed to hexavalent chromium.