

© Резуненко Ю.К., Прокопов В.О.

УДК: 614.777:543.39:547.42

АКТИВНІСТЬ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ В ОРГАНІЗМІ ЩУРІВ ЗА УМОВ ТРИВАЛОГО ВПЛИВУ ПОЛІОЛІВ НА ОСНОВІ ГЛІЦЕРОЛУ, ЕТИЛЕН- І ПРОПІЛЕНГЛІКОЛЮ

Резуненко Ю.К., Прокопов В.О.

Харківський національний медичний університет, м. Харків

Інститут гігієни та медичної екології ім. О.М. Марзєєва НАМН України, м. Київ

В работе исследована активность антиоксидантной системы крови крыс в условиях длительного воздействия промышленных химических загрязнителей окружающей среды – полиолов в дозах 1/10 и 1/100 LD₅₀, что является необходимым для раскрытия механизмов их биологического действия. Спектрофотометрическими и колориметрическими методами определена активность ферментативного звена антиоксидантной системы крови и содержание восстановленного глутатиона. Полиолы на основе глицерола (П-1103К, П-3003), этилен- и пропиленгликоля (П-1601Б, П-3502) в дозе 1/10 LD₅₀ на 30-е сутки влияют на активность супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы эритроцитов, каталазы крови, содержание восстановленного глутатиона на фоне повышения активности церулоплазмينا сыворотки крови. Доза 1/100 LD₅₀ вызывает снижение активности каталазы и супероксиддисмутазы на фоне повышения активности глутатионпероксидазы и церулоплазмينا, концентрации восстановленного глутатиона. Повышение показателей антиоксидантной системы свидетельствует об активации адаптивных реакций организма крыс в ответ на неблагоприятное воздействие веществ, а снижение – об усилении окислительного метаболизма, повышении продукции активных форм кислорода, активации процессов перекисного окисления липидов и белков, способных преодолеть барьер антиоксидантной защиты. Полученные результаты необходимы для гигиенического нормирования полиолов и составления прогноза их неблагоприятного влияния на здоровье населения.

Ключевые слова: полиолы, крысы, супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, церулоплазмин, глутатион.

Вступ

Наслідки активації вільнорадикальних процесів залежать від ефективності роботи системи антирадикального та антиперекисного захисту, діяльність якої направлена на утилізацію токсичних продуктів. Ця система включає ряд ферментів, низькомолекулярних сполук, фізіологічно активних речовин білкової та ліпідної природи, ефект захисту яких може бути реалізованим через інгібування радикалів перекисного типу та виділення їх з ланцюга окислення (принцип дії токоферолів), дезактивацію перекисних радикалів (принцип дії глутатіону, цистеїну), взаємодію з активними формами кисню, включаючи ферменти (супероксиддисмутазу, каталазу, глутатіонпероксидазу та інші) та через ряд інших процесів [1, 2]. Дослідження закономірності змін антиоксидантного статусу організму за умов дії хімічних факторів служить моделлю для характеристики його резистентності. Поліолі на основі гліцеролу (П-1103К, П-3003), етилен- і пропиленгліколю (П-1601Б, П-3502) належать до поширених промислових хімічних забруднювачів водоймищ, у тому числі, джерел водопостачання населення, що пов'язано з їх широким використанням у промисловості та побуті як миючих засобів, емульгаторів, антикорозійних і бактерицидних препаратів тощо [5]. Доведена можливість надходження речовин даного класу до організму людини із питною водою. Регламентація вмісту поліолів в об'єктах навколишнього середовища здійснюється на базі використання тимчасових розрахункових нормативів. Проте, механізми біологічної дії цих сполук вивчені недостатньо, а саме їхню ураху-

вання є підставою для адекватної регламентації та обґрунтування медико-біологічних і профілактичних заходів щодо захисту здоров'я населення та довкілля.

Робота виконана у рамках науково-дослідної роботи Харківського національного медичного університету «Вивчення механізмів біологічної дії простих полієфірів у зв'язку з проблемою охорони навколишнього середовища» (номер держреєстрації 0110U001812).

Метою дослідження була оцінка тривалого впливу поліолів на основі гліцеролу (П-1103К, П-3003), етилен- і пропиленгліколю (П-1601Б, П-3502) у дозах 1/10, 1/100 LD₅₀ на стан показників активності системи антирадикального та антиперекисного захисту в крові щурів.

Матеріали і методи дослідження

У роботі використано зразки речовин з регламентованими фізико-хімічними характеристиками: бутілаліловий ефір поліоксипропіленоксипропіленгліколю – П-1601Б, поліоксипропілентріол – П-1103К, поліоксипропіленоксипропілентріол – П-3003, поліоксипропіленгліколь – П-3502. Експерименти проведено на статевозрілих щурах-самцях лінії Вістар масою (180-220) г. Тварини утримувалися у стаціонарних умовах віварію за постійної температури та природного освітлення у пластикових клітках на збалансованому харчовому раціоні [6, 9]. Проведення процедур з експериментальними тваринами здійснено згідно з вимогами Державного комітету з етики. Щурів піддавали пероральній затравці, за допомогою зонда, водними розчинами речовин, щоденно одноразово

протягом 30 діб у дозах 1/10 і 1/100 LD₅₀. Це відповідно складало для П-1601Б – 0,385 і 0,0385 г/кг; П-1103К – 0,12 і 0,012 г/кг; П-3003 – 0,32 і 0,032 г/кг; П-3502 – 0,39 і 0,039 г/кг маси тварин. Тваринам контрольної групи вводили відповідні об'єми води. Дослідження біохімічних параметрів крові здійснювали на 30-ту добу після початку експерименту. Забій тварин проводили шляхом декапітації, попередньо анестезуючи тиопенталом натрію.

Активність супероксиддисмутази (СОД) (КФ 1.15.1.1) еритроцитів визначали спектрофотометричним методом при довжині хвилі 540 нм за ступенем інгібування відновлення нітросинього тетразолію [3]. Активність каталази (КТ) (КФ 1.11.1.6) визначали у гемолізаті крові спектрофотометричним методом [4], що базується на кольоровій реакції з молібдатом амонію, в результаті якої перекис водню утворює стійкий комплекс з солями молібдену. Активність церулоплазміну (ЦП) (КФ 1.16.3.1) визначали в сироватці крові за методом [11], що базується на реакції ферментативного окислення парафенілендіаміну, розчин якого готували безпосередньо перед використанням. Проби інкубували протягом однієї години у сухоповітряному термостаті при 37°C та колориметрували при 530 нм. Активність глутатіонпероксидази (ГПО) (КФ 1.11.1.9) еритроцитів визначали за методом [10]. Мірою активності ГПО була швидкість окислення відновленого

глутатіону (ВГ) в присутності гідроперекису третинного бутілу. Вміст ВГ визначали у гемолізаті крові спектрофотометричним методом за допомогою реактиву Елмана [7]. Для перевірки гіпотез щодо рівності генеральних середніх двох незалежних, незв'язаних вибірок використовували t-критерій Ст'юдента з попередньою перевіркою нормальності розподілу варіант [8].

Результати та їх обговорення

Першу лінію антирадикального та антиперекисного захисту складають ферменти – СОД і КТ. Досліджувані полііоли виявили суттєвий вплив на їх активність (табл. 1). Дія 1/10 LD₅₀ призвела до достовірного зниження активності СОД еритроцитів в середньому на 52% порівняно з контролем, при цьому найбільш виразний вплив виявив поліол 1103К (на 55%). Доза 1/100 LD₅₀ чинила таку ж спрямованість зміни активності СОД, але менш виразно – в середньому на 44%. При цьому найбільш сильна дія спостерігалася для поліолу 1103К (на 49%), а найменш – для 3502 (на 38%). На 30-ту добу за дії поліолів у дозах 1/10 і 1/100 LD₅₀ визначалося також й достовірне зниження в середньому на 52% і 23% активності КТ крові, порівняно з контролем. Для поліолу 1601Б це відповідно складало 51% і 22%, 1103К – 58% і 30%, 3003 – 58% і 23%, 3502 – 41% і 17%.

Таблиця 1

Вплив поліолів на активність супероксиддисмутази еритроцитів, каталази крові та вміст церулоплазміну сироватки щурів (30-а доба, M±m, n=10)

Поліол	Доза, LD ₅₀	Супероксиддисмутаза, ммоль/хв-г гемоглобіну	Каталаза, мкмоль/хв-г гемоглобіну	Церулоплазмін, мкмоль/л
1601Б	1/10	8,7±0,79*	224,8±12,6*	0,87±0,057*
	1/100	9,3±0,95*	354,9±30,8*	0,65±0,053*
1103К	1/10	7,5±0,71*	190,2±15,3*	0,93±0,082*
	1/100	8,6±0,83*	318,6±29,2*	0,74±0,072*
3003-2-60	1/10	7,9±0,82*	188,7±12,1*	0,79±0,068*
	1/100	9,2±0,86*	347,5±30,7*	0,68±0,056*
3502-2Б-40	1/10	8,4±0,85*	238,9±32,0*	0,91±0,083*
	1/100	10,4±0,92*	377,5±33,1*	0,74±0,057*
Контроль		16,8±1,62	454,2±32,3	0,46±0,042

Примітка: * - $p < 0,05$ відносно контролю

Достовірне зниження активності СОД та КТ за умов тривалого впливу досліджуваних речовин є однією з причин розвитку оксидативного стресу, так як дані ферменти несуть відповідальність за видалення первинних активних форм кисню – супероксидних аніон-радикалів і перекису водню.

ЦП – головний антиоксидантний білок плазми крові, якому притаманна СОД-подібна дія. Спостерігали достовірне, порівняно з контролем, підвищення його вмісту за умов впливу як 1/10 LD₅₀, так й 1/100 LD₅₀, яке складало відповідно 90% і 53%. Такі зміни можна розглядати як адаптивну реакцію організму щурів на несприятливий вплив поліолів.

У процесах інактивації гідроксипероксидів ліпідів значну роль відіграє ГПО. На 30-ту добу впливу по-

ліолів відмічалася різна динаміка змін активності ферменту, яка залежала від уведеної дози. Так, дія 1/10 LD₅₀ супроводжувалася суттєвим зниженням активності ГПО – на 57%, 68%, 61% і 50% відповідно для 1601Б, 1103К, 3003 і 3502, порівняно з контролем. Вплив 1/100 LD₅₀, навпаки, призводив до достовірного підвищення активності ГПО в середньому на 42%, при цьому найбільш виразну дію чинив поліол 1103К (табл. 2). Зниження активності ГПО можливо пов'язане з виснаженням компенсаторних реакцій, направлених на нормалізацію процесів перекисного окислення ліпідів за умов тривалого впливу речовин, а збільшення активності – може бути наслідком посилення адаптаційних реакцій в організмі експериментальних тварин.

Таблиця 2
Вплив поліолів на активність глутатіонпероксидази еритроцитів і вміст відновленого глутатіону крові щурів (30-а доба, $M \pm m$, $n=10$)

Поліол	Доза, LD ₅₀	Глутатіонпероксидаза, ммоль/хв·г гемолобіну	Відновлений глутатіон, ммоль/л
1601Б	1/10	0,12±0,009*	0,28±0,024*
	1/100	0,38±0,026*	0,77±0,081*
1103К	1/10	0,09±0,008*	0,19±0,020*
	1/100	0,42±0,035*	0,84±0,077*
3003-2-60	1/10	0,11±0,009*	0,31±0,026*
	1/100	0,39±0,040*	0,92±0,085*
3502-2Б-40	1/10	0,14±0,012*	0,28±0,019*
	1/100	0,40±0,032*	0,83±0,079*
Контроль		0,28±0,025	0,52±0,045

Примітка: * - $p < 0,05$ відносно контролю

Відомо, що всі тіолові сполуки мають антирадикальну й антиперекисну активність. У силу своєї гідрофільності вони функціонують як водорозчинні антиоксиданти, які захищають нуклеїнові кислоти, білки та інші компоненти клітин від оксидативного стресу. Наявність у молекулах тіолів гідрофобних груп робить можливим їх взаємодію з ліпідними структурами клітин. Співвідношення оксидантної та антиоксидантної систем підтримується на певному рівні співвідношенням сульфгідрильних і дисульфідних груп [12].

Тривалий вплив поліолів у дозі 1/10 LD₅₀ призвів до зниження вмісту ВГ у цільній крові щурів в середньому на 45% порівняно з контролем. Найбільш сильну зміну цього показника викликав поліол 1103К, а саме на 63%, найменш виразну – поліол 3003 на 40%. Доза 1/100 LD₅₀, як й у випадку активності ГПО, збільшувала вміст ВГ на 48%, 62%, 77% і 31% відповідно для 1601Б, 1103К, 3003 і 35020 (табл. 2). Рівень ВГ залежить від швидкості синтезу, катаболізму, а також стану ферментативних систем, які регулюють співвідношення його окислених і відновлених форм. Зниження вмісту ВГ під впливом 1/10 LD₅₀, ймовірно, пов'язано як з порушенням синтезу у зв'язку з гепатотоксичною дією цієї дози поліолів, так й з посиленням використанням відновленої форми для знешкодження продуктів вільнорадикального окислення. Підвищення вмісту ВГ за дії 1/100 LD₅₀ скоріше пов'язане з активацією адаптаційних механізмів у відповідь на тривалий вплив речовин.

Узагальнюючи отримані результати, можна зробити наступні висновки:

1. Тривала дія поліолів на основі гліцеролу (П-1103К, П-3003), етилен- і пропіленгліколю (П-1601, П-3502) призводить до напруження системи антирадикального та антиперекисного захисту в організмі щурів з поступовим виснаженням за дії 1/10 LD₅₀, що підтверджується зниженням активності супероксиддисмутази та глутатіонпероксидази еритроцитів, каталази крові, вмісту відновленого глутатіону.

2. На 30-ту добу досліджувані поліоли у дозах 1/10 і 1/100 LD₅₀ підвищують в сироватці крові вміст

церулоплазміну, що можна розглядати як адаптивну реакцію організму щурів на їх несприятливий вплив.

3. Зниження активності антиоксидантної системи щурів за умов тривалого впливу поліолів може бути викликаним посиленням окислювального метаболізму, збільшенням продукції активних форм кисню, активацією процесів перекисного окислення ліпідів і вільнорадикальної модифікації білків, здатних перебороти бар'єр антиоксидантного захисту.

Література

1. Барабой В.А., Сутковой Д.А. Окислительно-антиоксидантный гомеостаз в норме и патологии. – К.: Наукова думка, 1997. – 420 с.
2. Беленічев І.Ф., Губський Ю.І., Левицький Е.Л., Коваленко С.І., Марченко О.М. Антиоксидантна система захисту організму // Соврем. проблемы токсикологии. – 2003. – № 2. – С. 32-38.
3. Гуревич В.С., Конторидинова К.Н. Сравнительный анализ двух методов определения активности супероксиддисмутаза // Лаб. дело. – 1990. - № 4. – С. 44-47.
4. Дубинина Е.Е., Ефимова Л.Ф., Софронова Л.Н. Методы определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988. - № 8. – С. 16-19.
5. Жуков В.І., Попова Л.Д., Зайцева О.В., Кратенко Р.І. Простые и макроциклические эфиры: научные основы охраны водных объектов. – Х.: Торнадо, 2000. – 438 с.
6. Кожем'якін Ю.М., Хромов О.С., Філоненко М.А., Сайфетдінова Г.А. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними. – К.: Авіценна, 2002. – 156 с.
7. Кочетов Т.А. Практическое руководство по энзимологии. – М., 1980. – С. 217.
8. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 154 с.
9. Ланг С.М., Уилсон Д. Лабораторная крыса // Лабораторные животные. – 1993. – Т. 3, № 2. – С. 100-110.
10. Моин В.М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах // Лаб. дело. – 1986. - № 2. – С. 724-727.
11. Мошков К.А., Бурмистров С.О., Усатенко М.С., Гриненко А.Я., Петров В.П., Маслов В.Г., Бородкин Ю.С. Активность и содержание церулоплазмينا в крови людей при острой и хронической алкогольной интоксикации // Фармакология и токсикология. – 1986. – № 1. – С. 92-96.
12. Yang M. Effect of sulfhydryl reagents on spectrum states in the erythrocyte membrane // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1993. – Vol. 192, № 2. – P.918-925.

Summary

ACTIVITY OF ANTIOXIDANT SYSTEM IN RAT ORGANISM AT CONDITIONS OF PROLONGED INFLUENCE OF POLYOLS STRUCTURALLY BASED ON GLYCEROL, ETHYLEN- AND PROPYLENGLYCOLS

Resunenko Y.K., Prokopov V.A.

Key words: polyols, rats, superoxidedismutase, catalase, glytationeperoxidase, cerulloplasmin, glutathione.

The present study reports the results of investigation of rat's blood antioxidant system activity at conditions of prolonged influence of environmental chemical pollutants e.g. polyols in 1/10 and 1/100 LD₅₀. The work results make an important contribution in establishment of the substances biological action mechanism. The activity of blood antioxidant system en-

zymic link and reduced glutathione contents were investigated by spectrofluorometric and colorimetric methods. Polyols which are structurally based on glycerol (P-1103K; P-3003), ethylene- and propylenglyceols (P-1601B; 3502) in 1/10 LD₅₀ decrease the activity of erythrocytes superoxidedismutase and glutathione peroxydase, blood catalase, glutathione contents on the background of increase in blood serum ceruloplasmin activity. The substance 1/100LD₅₀ results in decrease of catalase and superoxide dismutase activity on the background of the increase in glutathione peroxidase and ceruloplasmin activities and in reduced glutathione contents. The induction of antioxidant system indices signifies the activation of rat organism's adaptive reactions as a response to the substances negative influence. On the contrary, the reduction of antioxidant system indices may testify of increase in oxidative metabolism, the increase in oxygen active forms production, lipids and proteins peroxidations e.g. the negative processes which are capable of overcoming antioxidant protection limits. The obtained results may be very useful in hygienic norming the polyols environmental limits threshold concentrations and elaboration of prognosis of the substances negative action on the population health.

Матеріал надійшов до редакції 23.11.2011