

## Корекція антиоксидантної та імунної систем при експериментальному кадмієвому токсикозі за допомогою ліпосом

Тернопільська державна медична академія ім. І.Я. Горбачевського

КОРЕКЦІЯ АНТИОКСИДАНТНОЇ ТА ІМУННОЇ СИСТЕМ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ КАДМІЄВОМУ ТОКСИКОЗІ ЗА ДОПОМОГОЮ ЛІПОСОМ – Метою нашої роботи було вивчення можливості корекції ліпосомами антиоксидантної системи та імунного статусу у тварин з кадмієвим токсикозом. Отримані результати дозволяють вважати доцільним використання ліпосом у терапії токсичного ураження організму кадмієм як потужний неспецифічний препарат антиоксидантної дії, який підвищує резистентність організму.

КОРРЕКЦИЯ АНТИОКСИДАНТНОЙ И ИММУННОЙ СИСТЕМ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ КАДМИЕВОМ ТОКСИКОЗЕ С ПОМОЩЬЮ ЛИПОСОМ – Целью нашей работы было изучение возможности коррекции с помощью липосом антиоксидантной системы и иммунного статуса у животных в условиях кадмиевого токсикоза. Полученные результаты позволяют рекомендовать использование липосом в терапии токсического поражения организма кадмием как мощный неспецифический препарат антиоксидантного действия, который повышает резистентность организма.

CORRECTION OF ANTIOXIDANT AND IMMUNE SYSTEMS OF RATS BY LIPOSOMES IN EXPERIMENTAL CADMIUM INTOXICATION – The aim of our work was to investigate the possibility of correction of antioxidant and immune systems in rats with cadmium intoxication by liposomes. Our results show, that liposomes can be used as antioxidant preparation increasing the organism resistance.

**Ключові слова:** ліпосоми, кадмієвий токсикоз, антиоксидантна система, імунний статус.

**Ключевые слова:** липосомы, кадмиевый токсикоз, антиоксидантная система, иммунный статус.

**Key words:** liposomes, cadmium intoxication, antioxidant system, immune status.

**ВСТУП** Ліпосоми – штучні сферичні везикули, які побудовані із фосфоліпідів і здатні виконувати роль носіїв, що цілеспрямовано доставляють лікарські речовини всередину клітин-мішеней. Своє застосування вони знайшли і в терапії уражень багатьма ксенобіотиками. Можливість корекції порушень захисних систем організму за допомогою ліпосом вивчало багато науковців. Вивчаючи роль ліпосом у системі біохімічного захисту клітини від пошкоджувальної дії вільних радикалів і продуктів пероксидації ліпідів при окремих патологіях. Єльський В.Н. та співавтори [2] встановили, що ліпосоми попереджують порушення антиоксидантної системи (АОС), оскільки, на думку авторів, здатні, взаємодіючи із клітинами печінки, модифікувати мембранні структури і підвищувати їх функціональну активність. Виявлено також [5,6] дезінтоксикаційні властивості ліпосом, встановлено, що більша половина їх потрапляє у печінку, 1/6 – селезінку, де вони захоплюються гепатоцитами і макрофагами. Завдяки тропності дії ліпосом можна, поміщаючи в них лікувальні середники, досягати лікувального ефекту за умов зниженої дози

останніх. Поряд із стабільною адсорбцією токсичних продуктів метаболізму на клітинній мембрані може відбуватися злиття ліпосом і мембран клітин з виходом вмістимого везикул у цитоплазму. Перенесена через цитоплазму ліпосомальна везикула руйнується ферментами ліпосом, що супроводжується кисневим вибухом з наступною утилізацією дериватів ліпосом і виведенням їх із організму. Оскільки основна частина введеного кадмію локалізована у середині клітини, ліпосоми завдяки піноцитозу чи злиттю з клітинною мембраною можуть направляти свій вміст усередину клітини. Це збільшує можливість попадання у клітину антиоксидантів у складі ліпосом і підвищення детоксикації кадмію. Крім цього, ефективність такої форми корекції може бути пов'язана із зростанням рівня антиоксидантів у пошкоджених органах тварин, що обумовлено тропністю ліпосом до цих органів.

**МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ** Досліди проводили на білих щурах-самцях лінії Вістар віком 6 місяців, які утримувалися на стандартному раціоні віварію. Кадмієвий токсикоз викликали шляхом внутрішньоочеревинного введення хлориду кадмію в дозі 7 мг/кг однократно. Бішарові ліпосоми готували із суміші яєчного холінфосфатиду і холестеролу (мольне співвідношення 9:2). У пробірку з цими препаратами вносили розчин Хенкса і озвучували на ультразвуковому диспергаторі із зануреним випромінювачем у режимі 44 кГц, 20-30 мкА, 3 хв [8]. В ліпосоми заключали 0,2 г манітолу та 0,11 мг цитохрому С із розрахунку на 100 мг ліпосом. Вибір цих складників пояснюється тим, що манітол і цитохром С є пастками гідроксильних та супероксиданіонрадикалів, а метіонін є донором сірки і метильних груп. Ліпосоми в концентрації 100 мг/мл вводили внутрішньоочеревинно 2 дні до і 2 дні після ураження кадмієм в дозі 1 г/кг. Тварини були розділені на три групи – інтактні, уражені та ліковані. Декапітацію під ефірним наркозом проводили на 1-у і 7-у доби експерименту. Показники досліджували у плазмі та сироватці крові, а також у гомогенаті печінки. Активність супероксиддисмутази (СОД) визначали за відомою методикою [10]. За 1 ум. од. брали таку кількість ферменту, яка здатна інгібувати відновлення нітротетразолію синього на 50 % . Каталазну (КТ) активність оцінювали за методом [4], виражаючи у кат/л. Вміст SH-груп визначали за Елманом [13]. Для встановлення активності глутатіонредуктази (ГР) користувалися методикою [5]. Концентрацію церулоплазміну (ЦП) і аскорбінової кислоти (АК) визначали за методиками відповідно [3] і [9]. У сироватці крові визначали вміст Ig A, Ig G, Ig M за методом [11] та кількість циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) за методом осадження їх розчином поліетиленгліколю-6000 [11]. Результати експерименту піддавали статистичному аналізу з використанням коефіцієнта Стьюдента.

**РЕЗУЛЬТАТИ дослідження та їх ОБГОВОРЕННЯ** У плазмі крові і гомогенаті печінки тварин досліджували показники АОС залежно від тривалості дії ксенобіотика. Результати експерименту, наведені в табл.1, показують, що усі досліджувані показники після введення тваринам хлориду кадмію зазнають змін порівняно до інтактних. Виходячи з того, що кадмій є тіоловою отрутою з вираженою мембранолітичною дією, можна вважати, що встановлене зменшення вмісту SH-груп у печінці є наслідком зв'язування кадмію із цими групами білків. За цих умов відбувається окиснення SH-груп та утворення металотіонеїнів, дія яких спрямована на зменшення токсичного впливу кадмію. Крім того, частина SH-груп витрачається на знешкодження пероксирадикалів, що посилено утворюються під впливом ксенобіотика. Підвищення вмісту SH-груп в крові на 1-й і 7-й дні експерименту в тварин може бути проявом компенсаторно-захисної реакції організму і пов'язана з посиленням метаболізму білків в печінці та виведенням у

кров сірковмісних продуктів, в тому числі і глутатіону, дія якого спрямована проти перекисного окиснення ліпідів. Корекція ліпосомами спричинила зростання кількості SH-груп у печінці достовірно у 3 рази на 7-у добу та нормалізацію рівня цих груп у крові. Очевидно, що середники, якими начинені ліпосоми, маючи антиоксидантну дію, запобігають окисленню цих груп.

**Таблиця 1. Показники АОС та імунної системи при кадмієвому токсикозі та після корекції ліпосомами ( $M \pm m$ ;  $n = 5-10$ )**

Дослідж. матеріал	Показники	Інтактні щурі	Уражені щурі 1 доба	Уражені щурі 7 доба	Ліковані щурі 1 доба	Ліковані щурі 7 доба
плазма крові	КТ (мккат/л)	0,20±0,02	0,24±0,01	0,27±0,02*	0,22±0,03	0,21±0,01**
	СОД(умод./мл)	1,24±0,03	0,23±0,01*	1,05±0,09*	0,37±0,04**	1,18±0,02
	ЦП ( $\times 10^3$ г/л)	263±4,8	252,0±2,6*	291,0±2,1*	256,0±1,9	260,0±1,9**
	-SH групи (мМ/л)	0,66±0,01	0,65±0,03*	0,73±0,02*	0,75±0,01**	0,63±0,05
	ГР (ММНАДФН <sub>2</sub> /хв/л)	0,90±0,03	0,54±0,02*	0,50±0,04*	0,60±0,01**	0,68±0,03**
гомогенат печінки	КТ (мккат/л)	2,56±0,05	2,17±0,04*	2,61±0,07	2,27±0,01**	2,56±0,02
	СОД (умод./мг)	0,56±0,02	0,41±0,02*	0,39±0,01*	0,46±0,03	0,50±0,02**
	АК (мкМ/г)	6,64±0,46	2,68±0,39*	2,39±0,41*	3,35±0,22	4,58±0,35**
	-SH групи (мкМ/г)	2,41±0,05	1,68±0,06*	2,12±0,04*	2,02±0,01**	2,27±0,02**
	ГР(ММНАДФН <sub>2</sub> /хв/г)	1,22±0,03	0,59±0,08*	0,74±0,05*	0,76±0,02**	1,16±0,01**
сироватка крові	Ig A (г/л)	0,53±0,03	0,40±0,015*	0,41±0,02*	0,47±0,02**	0,49±0,01**
	Ig M (г/л)	1,35±0,12	0,44±0,15*	0,46±0,12*	0,62±0,07	0,98±0,10**
	Ig G (г/л)	3,77±0,10	3,51±0,08*	5,52±0,20*	3,82±0,09**	3,93±0,10**
	ЦІК (ум.од)	41,0±0,86	46,0±1,92*	79,5±2,06*	54,0±1,15**	44,0±2,37**

Примітка. \* – зміни достовірні відносно до інтактних тварин ( $p < 0,05$ ); \*\* – зміни достовірні відносно до уражених тварин ( $p < 0,05$ );  $n=10$  – для інтактних тварин;  $n=5$  – для уражених.

Виразні зміни під впливом кадмію наставали і в активності антиоксидантних ферментів крові і печінки. Внаслідок руйнування плазматичних мембран гепатоцитів та виходу частини КТ із печінки в кров, спостерігали підвищення активності ферменту на 1-ий і 7-ий дні експерименту. Введення ліпосом регулювало активність ферменту у крові, яка на 7-у добу знижувалася на 22 % порівняно з ураженими тваринами. Такий ефект ліпосом може бути частково обумовлений прямим інгібуванням ПОЛ за рахунок холінфосфатиду, який має антиоксидантні властивості [1] та інших речовин, що входять в склад ліпосом. Важлива роль у знешкодженні супероксиданіонрадикалів в плазмі крові належить ЦП. Вміст ЦП на 1-у добу під впливом кадмію знижувався порівняно з інтактними тваринами, що є проявом його токсичної дії на печінку та зниженням її здатності синтезувати цей мідьвмісний білок. На 7-у добу концентрація ЦП зростала, можливо як наслідок компенсаторно-неспецифічної реакції організму на введений подразник. Застосування ліпосом наближало рівень ЦП до рівня інтактних тварин. У печінці у тварин в усі терміни активність СОД знижувалася. Аналогічні дані отримали інші автори [12,14]. Зниження активності СОД у гомогенаті можна пояснити, як пригніченням регуляторного впливу сульфгідрильних груп, так і пошкодженням активного центру СОД, що обумовлено незворотним зв'язуванням іонів міді та окисненням тіолових груп. Звертає на себе увагу однонаправленість змін вмісту ЦП і активності СОД у плазмі крові контрольних і лікованих тварин.

Зменшення активності СОД і рівня ЦП у перші дні в крові може бути зумовлено витісненням кадмієм із цих ферментів міді та зниженням їх синтезу. Активність СОД під впливом ліпосом на 7-у добу суттєво підвищувалася як у крові, так і у печінці на 61 % та 28 % відповідно.

Активність ГР, яка пов'язана з відновленим глутатіоном та глутатіонпероксидазою в єдину функціональну систему, під впливом кадмію протягом експерименту була знижена, що узгоджується із зменшенням вмісту SH-груп у крові і печінці тварин. Ліпосоми викликали суттєве зростання рівня активності ГР у печінці – у 2,3 раза та у крові – на 66 %, що може бути наслідком модифікації мембран клітин ліпосомами. Концентрація АК тварин протягом всього експерименту була зниженою порівняно з інтактними, що може бути наслідком витрачання її на інгібування вільнорадикального окиснення та відновлення окиснених вітамінів Е та А. Звідси величина концентрації АК може бути показником токсичності кадмію [15]. Концентрація АК на 7-у добу експерименту зростала у 1,9 раза після введення ліпосом, що свідчить про відновлення її кількості та зменшення її використання на процеси інгібування ПОЛ.

Властивість імунної системи знаходитись у динамічній рівновазі може порушуватися прямо чи опосередковано ксенобіотиками. При цьому хімічні сполуки діють на різні ланки імунної системи, проявляючи імуносупресивний чи імуностимулюючий ефекти.

Виражене підвищення рівня ЦІК ( у 1,5 і більше разів ) на 7-у добу після введення кадмію свідчить про деструкцію клітинних мембран, адже відомо, що хлорид кадмію як і інші його сполуки мають цитолітичну дію. Імунотоксичний вплив кадмію проявляється у зниженні уже на 1-у добу кількості імуноглобулінів усіх досліджуваних класів з поступовим збільшенням лише рівня Ig G на 7-у добу. Після введення ліпосом рівень IgA і IgM зростав на 7-у добу на 19,5 % та 113 % відповідно; кількість IgG та ЦІК зменшувалася на 29 % та 45 % відповідно і наближалися до величини інтактних тварин.

**ВИСНОВКИ** Гостре ураження кадмієм викликало суттєві зрушення з боку як АОС, так і імунної системи в обидва терміни дослідження, що зумовило пошук адекватного методу корекції. Використання ліпосом суттєво покращило стан захисних систем організму і, таким чином, попередило значні пошкодження, які здатний викликати цей важкий метал з властивою йому тропністю до тіолових груп.

1. Абрамова Ж.И., Оксенгендер Т.И. Человек и противовоспалительные вещества. – Л. :Ленинград, 1985. – 183с.
2. Ельский В.Н., Стефанов А.В., Мареева Т.Е., Колесникова С.В. и др. Влияние липосом на перекисное окисление липидов в сердце и печени при синдроме длительного раздавления // Укр. биохим. журн. – 1993. – 65, № 5. – С. 109 – 112.
3. Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии. – Минск: Беларусь, 1982. – 311с.
4. Корольюк М.А., Иванова Л.И. , Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения каталазы // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16 – 19.

5. Кругликова Г.О., Штутман Ц.М. Глутатіонпероксидазна та глутатіонредуктазна активність печінки щурів після введення селеніту натрію // Укр. біохім. журн. – 1976. – 48, № 2. – С. 223 – 228.
6. Липосомы в биологических системах / Под. ред. Г. Грегориадиса, А. Аллисона. – М.: Медицина, 1983. – 384с.
7. Марголис Л.Б., Бергельсон Л.Д. Липосомы и их взаимодействие с клетками. – М.: Наука, 1986. – 240 с.
8. Получение липосом с лекарственными препаратами / В.Г. Буткер, Т.Е. Вахрушева, Е.В. Киселева, Н.Б. Христолюбова // Хим. фармац. – 1987. – № 3. – С. 347 – 351.
9. Соколовский В.В., Лебедева Л.В. , Лиелуп Т.Б. О методе отдельного определения аскорбиновой, дегидроаскорбиновой декетогулоновой кислот в биологических тканях // Лаб. дело. – 1974. – № 3. – С. 160 – 162.
10. Чевари С., Чаба Й., Секей Й. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологическом материале // Лаб. дело. – 1985. – № 11. – С. 678 – 681.
11. Чернушенко Е.Ф., Когосова Л. Ф. Иммунологические методы исследования в клинике. – К. : Здоров'я, 1978. – 159 с.
12. Caisova D, Eybl V. The effect of cadmium and chelating agents on Cu Zn superoxididismutase activity in liver of mice // Plzen. lek. sb. – 1988. – suppl. № 56. – P. 137-139.
13. Ellman George L. Jisnee Sulfhydryl Groups // Arch. Biochem. and Biophys. – 1959. – 82. – P. 70 – 77.
14. Jamall Ijaz S., Sprowls Son S. Effect of cadmium and dietary selenium on cytoplasmic and mitochondriai antioxidant defence systems in the heart of rats fed high dietary copper // Toxicol. and Appl. Pharmacol. – 1987. – 87, № 1. – P. 102 – 110.
15. Pharikal K., Das P. C., Dey C.D., Dasgupta S. Tissue ascorbate as a metabolic marker in cadmium toxicity // Int. J. Vitam. and Nutr. Res. – 1988. – 58, № 3. – P. 306 – 311.