

Є. Б. Дмухальська, М. М. Корда, Т. Я. Ярошенко
ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І. Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО
МОЗ УКРАЇНИ

КОРИГУВАЛЬНИЙ ВПЛИВ ПЕПТИДІВ НА СТАН АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ ОРГАНІЗМУ ЩУРІВ, УРАЖЕНИХ СОЛЯМИ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ І ГЛІФОСАТОМ

Вступ. Відомо, що вплив різних забруднювачів навколишнього середовища, таких, як важкі метали і фосфорорганічні сполуки, викликає різні зміни в організмі людини, які супроводжуються порушенням балансу між процесами окиснення і відновлення, утворенням активних форм Оксигену, що пояснює розвиток оксидативного стресу. Важкі метали і фосфорорганічні сполуки, які використовують у сільському господарстві, спричиняють захворювання печінки й інших органів, що сприяє утворенню активних форм Оксигену, які можуть індукувати пероксидне окиснення ліпідів та пригнічувати антиоксидантну систему. В основі дії важких металів лежить блокування функціонально активних груп структурних протеїнів, протеїнів-ензимів, найбільше значення має блокування сульфгідрильних (тіольних, SH) груп. При дії важких металів більшість протеїнів втрачає свої фізико-хімічні та біологічні властивості, що призводить до порушення протеїнового й іншого обміну речовин. На сьогодні комбінована дія важких металів і фосфорорганічних пестицидів на антиоксидантну систему залишається недостатньо вивченою.

Мета дослідження – вивчити антиоксидантну активність пептидів *in vitro* й *in vivo* у щурів різного віку, уражених Плюмбуму ацетатом, Купрумсу сульфатом і гліфосатом (у формі гербіциду раундапу).

Методи дослідження. Антиоксидантну активність пептидів визначали *in vitro* й *in vivo*. У дослідженнях *in vitro* використовували методи оцінки антиоксидантної активності: при неферментативній ініціації вільнорадикального окиснення солями заліза (II); гальмування аутоокиснення адреналіну в адренохром; за інгібуванням окисної модифікації протеїну, викликаній реактивом Фентона. Дослідження *in vivo* проводили на лабораторних нелінійних білих щурах-самцях трьох вікових груп (статевонезрілих, статевозрілих і старих), яким внутрішньошлунково протягом 30 днів вводили водні розчини Плюмбуму ацетату, Купрумсу сульфату і гліфосату. З метою корекції на 21-й день через 6 год після введення токсикантів упродовж 10 днів вводили пептиди. У сироватці крові й гомогенаті печінки уражених та коригованих тварин визначали глутатіонпероксидазну, глутатіонредуктазну, каталазну, супероксиддисмутазну активність і вміст SH-груп спектрофотометричним методом.

Результати й обговорення. Важкі метали і фосфорорганічні сполуки викликали утворення активних форм Оксигену, таких, як іони супероксиду, Гідроген пероксид та гідроксильні радикали. При комбінованій дії Плюмбуму ацетату, Купрумсу сульфату і гліфосату з віком активувалися процеси вільнорадикального окиснення ліпідів та генерація активних форм Оксигену в щурів, про що свідчило зниження глутатіонпероксидазної, глутатіонредуктазної, каталазної, супероксиддисмутазної активності, рівня SH-груп у сироватці крові й гомогенаті печінки уражених тварин. Введення пептидів як чинників корекції сприяло підвищенню активності ензимів антиоксидантної системи, що вказує на антиоксидантні властивості пептидів.

Висновки. Досліджувані пептиди проявляють антиоксидантну активність *in vitro*. Ураження щурів Плюмбуму ацетатом, Купрумсу сульфатом і гліфосатом у дозі 1/20 LD₅₀ призводить до пригнічення антиоксидантної системи, про що свідчить зниження активності ензимів та вмісту глутатіону в сироватці крові й гомогенаті печінки. Введення ураженим тваринам пептидів як коригувальних чинників підвищує в сторону норми глутатіонпероксидазну, глутатіонредуктазну, каталазну, супероксиддисмутазну активність.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: Плюмбуму ацетат; Купрумсу сульфат; гліфосат; оксидативний стрес; антиоксидантна система.

ВСТУП. Окисно-відновні реакції відіграють важливу роль в обміні речовин та є основним джерелом енергії у клітинах живих організмів. Цей процес може бути здійснений трьома основними шляхами: приєднанням Оксигену до атома Карбону, відщепленням Гідрогену, втраченою електрона. У клітинах тварин і людини

© Є. Б. Дмухальська, М. М. Корда, Т. Я. Ярошенко, 2024.

окиснення перебігає у формі послідовного перенесення Гідрогену та електронів від субстрату до кінцевого акцептора електронів – молекулярного кисню [1].

Окисні процеси, що проходять за наявності кисню, є найважливішим джерелом енергії, водночас при порушенні механізму біологічного окиснення вони набувають некерованого, лан-

цюгового характеру з утворенням активних форм Оксигену і Нітрогену та інших вільних радикалів [2].

Кисень, зокрема його активні вільнорадикальні форми (супероксиданіон-радикал (O_2^-), гідроксильний радикал (OH^\cdot), Гідроген пероксид (H_2O_2)), починають окиснювати структури самої клітини. Особливо чутливими до таких атак є ненасичені ліпіди, фосфоліпіди, які входять до складу клітинних та внутрішньоклітинних мембран, протеїни й амінокислоти, молекули ДНК, що викликає мутації, спадкові дефекти, онкологічні захворювання, захворювання серцево-судинної системи та руйнування клітин на молекулярному рівні [3].

За фізіологічних умов низький внутрішньоклітинний вміст первинних радикалів Оксигену та продуктів вільнорадикального окиснення забезпечується функціонуванням антиоксидантної системи організму. Розрізняють кілька фізіологічних механізмів знешкодження вільних радикалів. Першим бар'єром, що пригнічує дію реакції вільнорадикального окиснення, є біологічні рідини, які містять глікопротеїни, біоантиоксиданти неензимної дії (біофлавоноїди, вітаміни, іони металів, амінокислоти, глутатіон, церулоплазмін, трансферин та інші речовини), здатні інактивувати Гідроген пероксид і гідроксильний радикал, другим – екстрацелюлярні ензими, що мають антиоксидантну дію, третім – внутрішньоклітинні антиоксидантні системи.

Надмірне продукування активованих оксигено- і нітрогеновмісних метаболітів або порушення функціонування антиоксидантної системи призводить до розвитку оксидативного стресу, наслідком якого може стати загибель клітин організму [4].

Для людини та інших живих організмів Купрум одночасно є незамінним і токсичним елементом. Як незамінний елемент Купрум впливає на функціонування серцево-судинної, нейроендокринної систем, еластичність легень, метаболізм заліза тощо [5]. Його іони входять до складу ензимів, таких, як цитохром-с-оксидаза в мітохондріях, лізіоксидаза в сполучній тканині, дофамін-монооксигеназа в мозку та церулоплазмін, що беруть участь в аеробному метаболізмі. Як кофактор апо-купрум-цинку супероксиддисмутази (apoCuZnSOD) Купрум знешкоджує активні форми Оксигену і захищає від ушкодження вільними радикалами протеїни, мембранні ліпіди та нуклеїнові кислоти в усіх клітинах організму [6]. Але надлишок цього хімічного елемента проявляє токсичну дію насамперед на ензими організму. Зв'язуючись із сульфгідрильними складовими останніх, він викликає кисневе голодування в тканинах орга-

нізму людини. Перевищення концентрації міді у сироватці крові та шкірі призводить до депігментації останньої (вітиліго). Сполуки Купруму спричиняють різку подразнювальну дію на слизові оболонки верхніх дихальних шляхів і шлунково-кишкового тракту.

Свинець належить до найпоширеніших токсикантів із групи важких металів, ВООЗ внесла його до списку пріоритетних забруднювачів [7]. За ступенем токсичності він посідає четверте місце після талію, ртуті, кадмію, його широко застосовують у багатьох галузях промисловості [8].

Протягом життя організм людини акумулює 50–350 мг свинцю, до 90 % якого депонується в кістки, незначна частина – в нігті, волосся і виділяється із сечею [9].

Свинець – отрута, що впливає на нервову, ендокринну, кровоносну системи, пригнічує ферментативні процеси перетворення порфіринів та інкорпорацію заліза на протопорфірин з утворенням гему [10].

Для послаблення токсичної дії та виведення з організму важких металів застосовують комплексоутворювачі, які мають здатність утворювати з металами нетоксичні сполуки (хелати) і цим послаблювати їх токсичну дію в організмі [9]. Гепатозахисний ефект проявляють сполуки, які містять у своїй структурі сульфгідрильні групи (SH-групи). До сполук, які часто використовують з метою знешкодження гепатотропних ксенобіотиків, належать унітіол, цистеїн, ацетилцистеїн, цистамін тощо [11, 12].

У літературі є дані про участь амінокислот та олігопептидів у вільнорадикальних процесах [12]. Активно включаються в ці процеси сірковмісні амінокислоти, ароматичні – триптофан, тирозин, фенілаланін, гістидин, пролін. Гістидин є не тільки пасткою вільних радикалів, а й хелатором. У плазмі крові він утворює комплекс із міддю, що бере участь у дисмутації O_2^- [13, 14]. Будучи фізіологічно активними сполуками, пептиди проявляють модулюючу дію на функціональний стан усіх складових ланок гомеостазу людини і тварини. Тому з метою корекції порушень, викликаних Плюмбуму ацетатом, Купруму сульфатом і гліфосатом (у формі гербіциду раундапу), ми використовували пептиди: цистеїл-аланіл-тирозил-гістидил-аргініл-лейцил-аргініл-аргініл-цистеїн (пептид 1), проліл-ізолейцил-глутаміл-валіл-цистеїл-метіоніл-тирозил-аргініл-глутаміл-проліл-валін (пептид 2), цистеїл-гістидил-тирозил-гістидил-ізолейцин (пептид 3). Пептиди синтезовано на кафедрі супрамолекулярної хімії та біохімії Інституту високих технологій Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Мета дослідження – вивчити антиоксидантну активність пептидів *in vitro* й *in vivo* у щурів різного віку, уражених Плюмбуму ацетатом, Купруму сульфатом і гліфосатом (у формі гербіциду раундапу).

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Пептиди: цистеїл-аланіл-тирозил-гістидил-аргініл-лейцил-аргініл-аргініл-цистеїн (пептид 1), проліл-ізолейцил-глутаміл-валіл-цистеїл-метіоніл-тирозил-аргініл-глутаміл-проліл-валін (пептид 2), цистеїл-гістидил-тирозил-гістидил-ізолейцин (пептид 3) синтезовано на кафедрі супрамолекулярної хімії та біохімії Інституту високих технологій Київського національного університету імені Тараса Шевченка за принципом твердофазного синтезу [15].

Антиоксидантну активність пептидів *in vitro* вивчали на моделях ініціації утворення активних форм Оксигену та їх біологічної дії [16].

Метод оцінки гальмування аутоокиснення адреналіну [16] базується на реакції неферментативного окиснення адреналіну в адренохром у лужному середовищі, що супроводжується накопиченням супероксиданіон-радикала. Тому здатність пептидів гальмувати аутоокиснення адреналіну в адренохром у водному середовищі можна використовувати для кількісної оцінки антиоксидантної активності досліджуваних сполук.

Антиоксидантну активність досліджуваних препаратів виражали у відсотках та обчислювали за формулою:

$$AOA = \frac{(E_1 - E_2)}{E_1} \cdot 100,$$

де АОА – антиоксидантна активність;

E_1 – оптична густина контрольного розчину;

E_2 – оптична густина розчину за наявності досліджуваних пептидів.

Іншою моделлю визначення антиоксидантної активності пептидів *in vitro* була реакція неферментативної ініціації вільнорадикального окиснення. Антиоксидантну активність пептидів досліджували на моделі неферментативного ініціювання перексидного окиснення ліпідів реактивом Фентона. Метод ґрунтується на оцінці інгібуючого впливу пептидів на вільнорадикальне окиснення, яке ініціювали в ліпосомах курячого яйця іонами Fe^{2+} , що моделює неферментативний процес ліпопереокиснення. За наявності іонів Fe^{2+} в системі утворюються гідроксил-радикали, які є ініціаторами окиснення SH-групи протеїнів і ланцюгових реакцій перексидного окиснення ліпідів, при цьому утворюється малоновий діальдегід. Вміст малонового діальдегіду, що накопичується за умов ініціації вільнорадикального окиснення *in vitro*, визначали за кількістю забарвленого тримети-

нового комплексу, який утворюється під час взаємодії малонового діальдегіду з 2-тіобарбітуровою кислотою в кислому середовищі.

Антиоксидантну активність досліджуваних препаратів виражали у відсотках та обчислювали за формулою:

$$AOA = \frac{(C_0 - C_x)}{C_0} \cdot 100,$$

де АОА – антиоксидантна активність;

C_0 – концентрація малонового діальдегіду в контрольних пробах;

C_x – концентрація малонового діальдегіду в досліджуваних пробах.

Для порівняння антиоксидантної активності пептидів *in vitro* використовували відомий дипептид, L-карнозин (β-аланіл-L-гістидин).

Антиоксидантну активність пептидів *in vivo* оцінювали на лабораторних нелінійних білих щурах-самцях трьох вікових груп: статевонезрілих (молодих масою 70–90 г і віком 1–3 місяці), статевозрілих (дорослих масою 170–210 г та віком 5–8 місяців), старих (масою 250–300 г і віком 20–24 місяці) [17] з хімічним токсикозом.

Хімічний токсикоз у щурів викликали шляхом одночасного щоденного перорального введення впродовж 30 днів водних розчинів Плюмбуму ацетату $((CH_3COO)_2Pb)$ у дозі 11 мг/кг маси тіла (1/20 LD_{50}), Купруму сульфату $(CuSO_4)$ у дозі 13 мг/кг маси тіла (1/20 LD_{50}), гліфосату (в формі гербіциду раундапу) у дозі 250 мг/кг маси тіла (1/20 LD_{50}). Як контроль використовували інтактних тварин, яким вводили питну водопровідну дехлоровану воду. З метою корекції виявлених порушень на 21-й день експерименту через 6 год після введення токсикантів щодня впродовж 10 днів вводили внутрішньом'язово водну суспензію цистеїл-аланіл-тирозил-гістидил-аргініл-лейцил-аргініл-аргініл-цистеїну (пептид 1) у дозі 12 мг/кг маси тіла, проліл-ізолейцил-глутаміл-валіл-цистеїл-метіоніл-тирозил-аргініл-глутаміл-проліл-валіну (пептид 2) у дозі 1 мг/кг маси тіла, цистеїл-гістидил-тирозил-гістидил-ізолейцину (пептид 3) у дозі 9 мг/кг маси тіла. Дозу пептидів визначали експериментально.

Усіх піддослідних тварин поділили на такі групи: 1-ша – інтактні (контрольні); 2-га – уражені водними розчинами Плюмбуму ацетату, Купруму сульфату і раундапу; 3-тя – уражені з корекцією пептидом 1; 4-та – уражені з корекцією пептидом 2; 5-та – уражені з корекцією пептидом 3. На 31-шу добу після останнього введення ксенобіотиків та чинника корекції щурів виводили з експерименту за умов використання тіопентал-натрієвого (внутрішньочеревне введення 1 % розчину з розрахунку 50 мг/кг маси тварини) наркозу.

Стан антиоксидантної системи у сироватці крові й гомогенаті печінки уражених та коригованих щурів оцінювали за глутатіонпероксидазою (ГП, КФ 1.11.1.9), глутатіонредуктазою (ГР, КФ 1.8.1.7), каталазою (КФ 1.11.1.6), супероксиддисмутазою (СОД, КФ 1.15.1.1) активністю та вмістом SH-груп. Вміст SH-груп визначали за реакцією з 5,5-дитіобіс-2-нітробензойною кислотою (реактив Елмана) за методикою І. Ф. Мешишена [18], ГП активність – за кількістю НАДФН, що утворюється під час окиснення відновленого глутатіону [19], ГР активність – за зменшенням кількості НАДФН₂ у реакційному середовищі [20], СОД активність – за методом [21], який ґрунтується на здатності супероксиддисмутази інгібувати аутоокиснення адреналіну, каталазну активність – за методом [22], що базується на здатності Гідроген пероксиду утворювати з молібдатом амонію стійкий забарвлений комплекс із максимумом поглинання при $\lambda=410$ нм. Усі визначення проводили на біохімічному аналізаторі Humalyzer 2000.

Під час проведення досліджень усі піддослідні тварини перебували у віварії Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України на стандартному раціоні відповідно до санітарно-гігієнічних норм. Утримували щурів та виконували всі експерименти на них із дотриманням національних (Закон України “Про захист тварин від жорстокого поводження” від 21.02.2006 р. № 3447-IV) і міжнародних (Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей, Страсбург, 18.03.1986 р.) загальних правил і рекомендацій щодо гуманного поводження з лабораторними тваринами [23–25].

Статистичну обробку цифрових даних здійснювали за допомогою програмного забезпечення Excel (“Microsoft”, США) і STATISTICA 6.0 (“Statsoft”, США) з використанням непараметричних методів оцінки одержаних даних. Для всіх показників розраховували значення середньої арифметичної вибірки (M), її дисперсії і помилки середньої (m). Достовірність різниці значень між незалежними кількісними величинами встановлювали за допомогою критерію Манна – Уїтні. Зміни вважали статистично достовірними при $p < 0,05$ [26].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. На моделі аутоокиснення адреналіну *in vitro* визначено антиоксидантну активність пептидів. Результати дослідження, які наведено на рисунку 1, показали, що антиоксидантна активність пептиду 3 була вищою, ніж активність L-карнозину. Так, антиоксидантна активність розчину пептиду 3

виявилась у 2,9 раза більшою, ніж активність розчину L-карнозину, антиоксидантна активність розчину пептиду 1 – у 2,6 раза вищою за активність L-карнозину та на 13,6 % нижчою за активність пептиду 3, а антиоксидантна активність пептиду 2 – в 1,5 раза більшою, ніж активність L-карнозину, і на 48,3 % меншою, ніж активність пептиду 3.

Отже, пептид 3 проявив вищу антиоксидантну активність, ніж L-карнозин, пептид 1 і пептид 2.

Іншою моделлю визначення антиоксидантної активності пептидів *in vitro* була реакція неферментативної ініціації вільнорадикального окиснення яєчних ліпопротеїнів реактивом Фентона (рис. 2). Антиоксидантну активність пептидів визначали шляхом інгібування утворення активних форм Оксигену за умов експериментального оксидативного стресу на моделі вільнорадикального окиснення ліпопротеїнів у суспензії, оцінювали за утворенням ТБК-активних продуктів. Антиоксидантна активність усіх досліджуваних речовин була вищою порівняно з L-карнозином. Так, антиоксидантна активність пептиду 3 виявилась у 3,4 раза більшою, ніж активність L-карнозину, а антиоксидантна активність пептиду 1 і пептиду 2 – у 3,1 і 2,1 раза

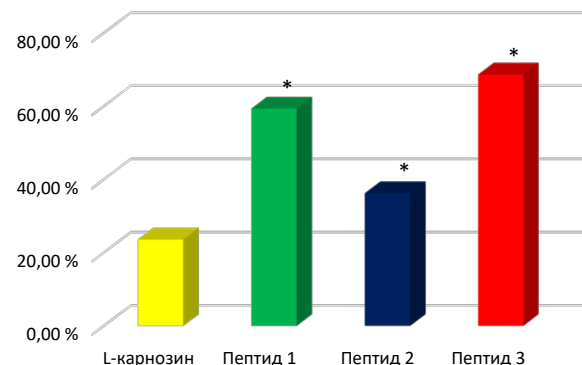


Рис. 1. Антиоксидантна активність пептидів *in vitro* за умов аутоокиснення адреналіну (M, n=5).

Примітка. Тут і на рисунку 2: * – результати достовірні щодо L-карнітину ($p < 0,05$).

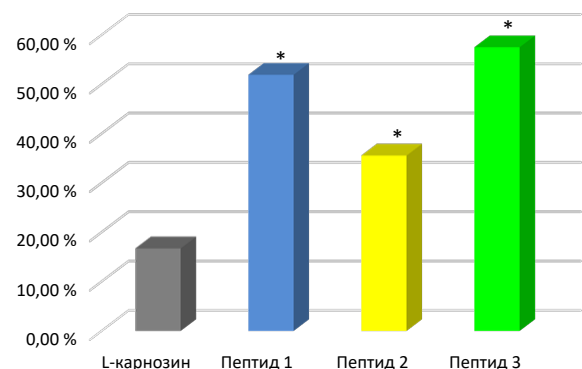


Рис. 2. Антиоксидантна активність пептидів *in vitro* за умов штучного оксидативного стресу на моделі суспензії яєчних ліпідів (M, n=5).

відповідно (див. рис. 2). Отже, пептиди проявили вищу антиоксидантну активність порівняно з L-карнозином.

На нашу думку, здатність пептидів інгібувати вільнорадикальні процеси може бути пов'язана з перерозподілом електронної густини в молекулі пептидів і можливим створенням "антирадикальної пастки" за рахунок тіо-групи цистеїну, фенільного кільця тирозину та імідазольного кільця гістидину, молекули пептидів.

Інтоксикація Плюмбуму ацетатом, Купруму сульфатом і фосфорорганічним пестицидом (раундапом) супроводжувалася порушенням балансу між про- й антиоксидантами, розвитком оксидативного стресу, що може викликати функціональні та структурні ушкодження клітинних

мембран, накопичення токсичних метаболітів, отруєння організму [27].

У своїх дослідженнях для вивчення впливу ксенобіотиків на стан антиоксидантної системи у щурів ми оцінювали показники, які найчастіше визначають в експерименті та клініці: вміст SH-груп, супероксиддисмутазу, каталазу, глутатіонредуктазу, глутатіонпероксидазу активність. На рисунках 3–5 показано результати досліджень вмісту SH-груп, активності ензимів у сироватці крові й гомогенаті печінки інтактних та уражених ксенобіотиками тварин різного віку.

Результати наших досліджень свідчать про те, що з віком у сироватці крові й гомогенаті печінки інтактних тварин пригнічувалась активність антиоксидантної системи (див. рис. 3–5),

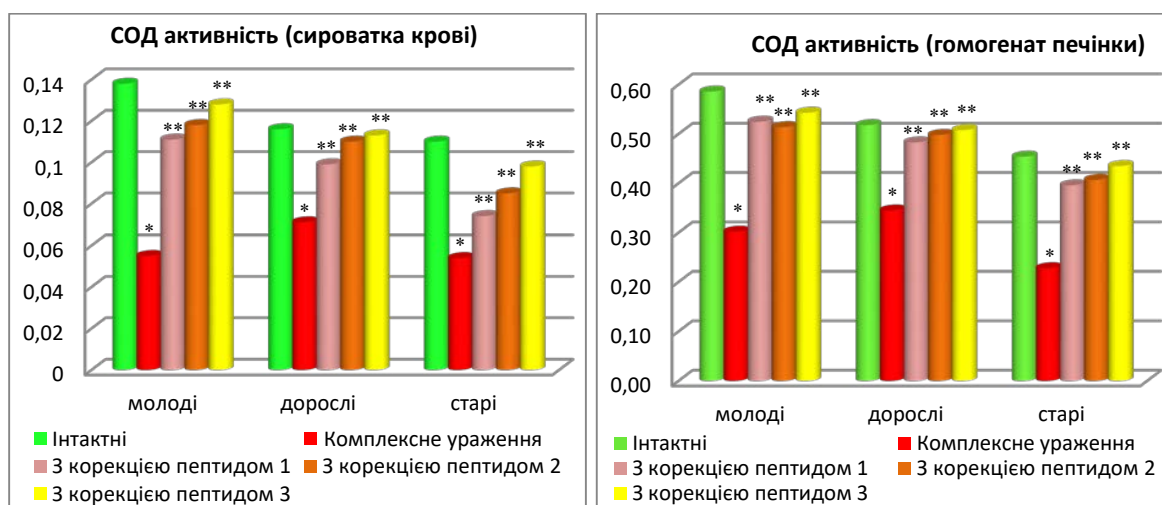


Рис. 3. Зміни супероксиддисмутазної активності (ум. од./г протеїну) в сироватці крові та гомогенаті печінки щурів при тривалому комбінованому ураженні Плюмбуму ацетатом, Купруму сульфатом, гліфосатом і корекції пептидами (М, n=10).

Примітка. Тут і на рисунках 4, 5: * – результати достовірні щодо інтактних тварин ($p < 0,05$); ** – результати достовірні щодо показників у щурів при комбінованому ураженні ($p < 0,05$).

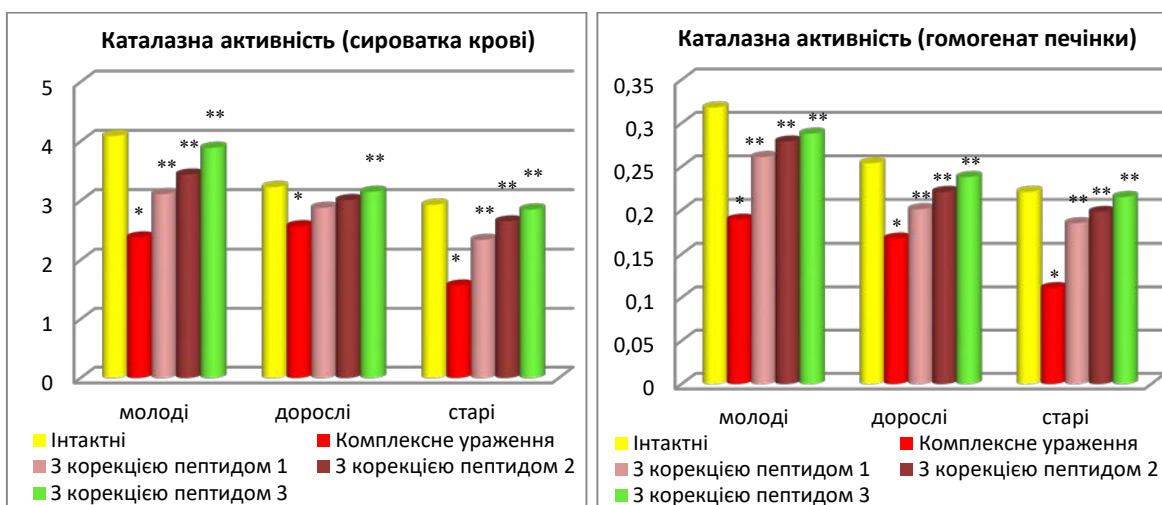


Рис. 4. Зміни каталазної активності (мкат/г протеїну крові, мкат/г протеїну печінки) у сироватці крові та гомогенаті печінки щурів при тривалому комбінованому ураженні Плюмбуму ацетатом, Купруму сульфатом, гліфосатом і корекції пептидами (М, n=10).

знижувалась концентрація неензимних антиоксидантів і пригнічувалась активність деяких ензимів глутатионової системи. Так, вміст SH-груп (див. рис. 5) найменшим був у старих (24-місячних) щурів: у сироватці крові – $(4,91 \pm 0,08)$ ммоль/л, у гомогенаті печінки – $(5,65 \pm 0,08)$ ммоль/л.

Подібно знижувалася супероксиддисмутаза, каталазна, глутатіонредуктазна, глутатіонпе-

роксидазна активність. Так, у сироватці крові старих тварин СОД активність становила $(0,110 \pm 0,006)$ ум. од./г протеїну, ГР активність – $(12,9 \pm 0,5)$ мкмоль/(хв·г протеїну), ГП активність – $(35,7 \pm 0,7)$ мкмоль/(хв·г протеїну), а в гомогенаті печінки СОД активність складала $(0,454 \pm 0,027)$ ум. од./г протеїну, ГР активність – $(7,8 \pm 0,4)$ мкмоль/(хв·г протеїну), ГП активність –

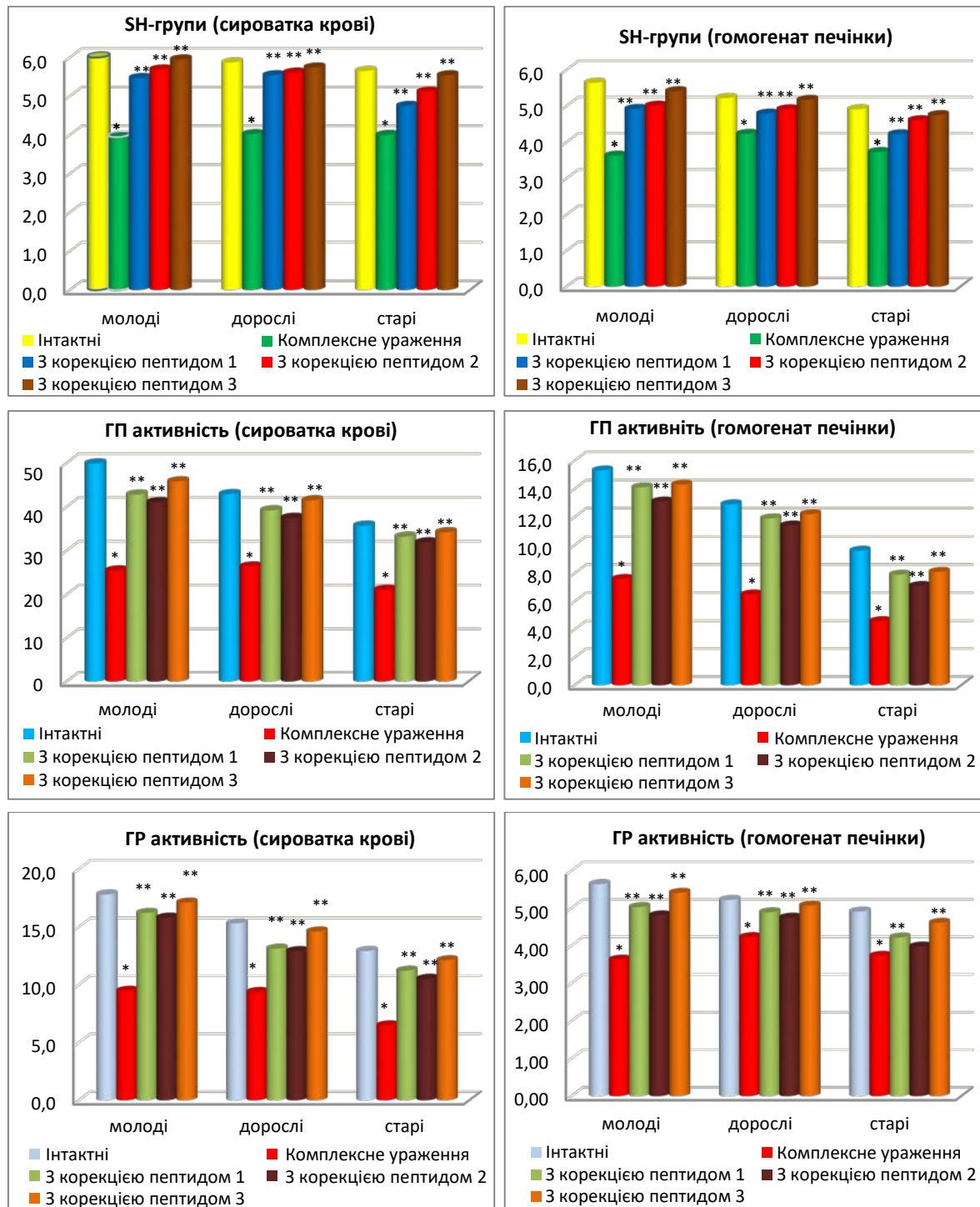


Рис. 5. Зміни вмісту SH-груп (ммоль/л), глутатіонпероксидазної (мкмоль/(хв·г протеїну)) і глутатіонредуктазної (мкмоль/(хв·г протеїну)) активності у сироватці крові та гомогенаті печінки щурів при тривалому комбінованому ураженні Плюмбуму ацетатом, Купруму сульфатом, гліфосатом і корекції пептидами (М, n=10).

(9,8±0,6) мкмоль/(хв·г протеїну). Такі зміни можна пояснити тим, що з віком пригнічуються синтез антиоксидантів та біологічні функції, вони зумовлені поступовою втратою клітинами організму здатності реагувати на ушкодження, спричинені активними формами Оксигену і посиленням використання антиоксидантів на знешкодження вільних радикалів, вміст яких зростає [28].

При комбінованому ураженні Плюмбуму ацетатом, Купруму сульфатом і гліфосатом вміст SH-груп, супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіонпероксидаза і глутатіонредуктаза активність достовірно знижувалися, порівняно з нормою (інтактні тварини), у сироватці крові та гомогенаті печінки щурів усіх вікових груп. Мінімальне значення відновленого глутатіону спостерігали у сироватці крові й гомогенаті печінки 3-місячних щурів – 64,8 та 56,4 % відповідно від рівня інтактних тварин (див. рис. 5). Таке істотне зменшення вмісту відновленого глутатіону в сироватці крові, можливо, пов'язане з тим, що іони Плюмбуму є тіловою отрутою і, взаємодіючи із SH-групами, окиснюють їх або утворюють комплексні сполуки, чим частково знижують свою токсичність, що проявляється пригніченням функцій протеїнів, у тому числі ензимів з антиоксидантними властивостями.

Мінімальне значення ГП і ГР активності ми спостерігали у сироватці крові молодих тварин. Так, у 3-місячних щурів вона була суттєво нижчою, ніж у 6- та 24-місячних, і становила 53,6 та 54,4 % відповідно від рівня інтактних тварин (див. рис. 5). Щодо ГП і ГР активності в гомогенаті печінки, то мінімальною ГП активність була у 24-місячних щурів, вона становила 46,9 % від рівня інтактних тварин, а ГР активність найменшою виявилась у гомогенаті печінки 3-місячних щурів та складала 46,2 % від рівня інтактних тварин. Такі зміни даних показників у щурів цих вікових груп можна пояснити тим, що в молодих тварин ще не до кінця сформована антиоксидантна система, а в організмі старих щурів відбувається дисбаланс і порушується рівновага між процесами у про- й антиоксидантній системах, що сприяє підвищенню вмісту активних форм Оксигену і посиленню процесів пероксидного окиснення ліпідів, тому знижується концентрація неензимних та ензимних антиоксидантів [27, 28].

Подібно знижувалась СОД активність у сироватці крові уражених тварин усіх вікових груп (див. рис. 3). При комбінованій дії токсикантів цей показник зменшувався і у сироватці крові, і у гомогенаті печінки 3- й 24-місячних щурів. У сироватці крові молодих щурів СОД активність знизилася на 60,1 %, а в гомогенаті печінки – на

48,5 % порівняно з інтактними тваринами. В організмі старих тварин при комбінованій дії токсикантів ензимна СОД активність зазнала змін у сторону зменшення, у сироватці крові вона становила 53,6 %, а в гомогенаті печінки – 50,2 % від рівня контролю (див. рис. 3).

Таке зменшення СОД активності можна пояснити тим, що іони Плюмбуму, надмірна концентрація іонів Купруму та гліфосат, який міститься в пестициді, посилюють процеси пероксидного окиснення ліпідів, у результаті чого утворюється Гідроген пероксид, який є інгібітором ензиму. При низькій СОД активності реакція спонтанної дисмутації супероксиданіон-радикала призводить до утворення H_2O_2 , який у клітинах руйнує каталазу [9]. Хімічне ураження печінки спричиняє зменшення активності цього гемовмісного ензиму в крові й печінці. Максимальне зниження каталазної активності спостерігають у старих тварин при комбінованій дії Купруму сульфату, Плюмбуму ацетату, гліфосату, в крові вона становила 53,6 %, у гомогенаті печінки – 50,2 % від рівня контролю.

Отже, хімічне ураження печінки призводить до зменшення каталазної, СОД активності, вмісту SH-груп і активності ензимів глутатіонової системи у сироватці крові й гомогенаті печінки всіх уражених тварин.

Для корекції порушень, викликаних Плюмбуму ацетатом, Купруму сульфатом і гліфосатом ми використали пептиди: цистеїл-аланіл-тирозил-гістидил-аргініл-лейцил-аргініл-аргініл-цистеїн (пептид 1), проліл-ізолейцил-глутаміл-валіл-цистеїл-метіоніл-тирозил-аргініл-глутаміл-проліл-валін (пептид 2), цистеїл-гістидил-тирозил-гістидил-ізолейцин (пептид 3). Введення ураженим щурам пептидів сприяло частковій нормалізації активності ензимів антиоксидантної системи та вмісту SH-груп. При дослідженні коригувальної дії пептидів ми помітили, що пептид 3 проявив кращий ефект порівняно з пептидами 1 і 2, що, очевидно, пов'язано з наявністю в пептиду кращих антиоксидантних та комплексоутворювальних властивостей за рахунок вільних тіольних і гідроксильних груп.

ВИСНОВКИ. 1. На моделі аутоокиснення адреналіну *in vitro* визначено антиоксидантну активність пептидів. Пептиди проявляють вищу антиоксидантну активність, ніж L-карнозин. Проведено дослідження антиоксидантної активності пептидів *in vitro*. Антиоксидантна активність пептиду 3 вища у 2,9 раза порівняно з L-карнозином, а пептиду 1 і пептиду 2 – у 2,6 й 1,5 раза відповідно.

2. Одночасне введення Плюмбуму ацетату, Купруму сульфату і гліфосату (в формі раунда-

пу) в допорогових дозах (1/20 LD₅₀) супроводжується зростанням вільнорадикального окиснення, що викликає зниження глутатіонпероксидазної, глутатіонредуктазної, каталазної, супероксиддисмутазної активності та вмісту SH-груп у щурів усіх вікових груп, особливо молодих тварин.

3. Введення ураженим щурам пептидів як коригувальних чинників підвищує в сторону

норми вміст SH-груп та активність ензимів антиоксидантної системи, що, очевидно, вказує на антиоксидантні властивості пептидів.

Перспективи подальших досліджень.

Заплановано вивчити коригувальний вплив пептидів на зміни показників ліпідного обміну в щурів, уражених Плюмбуму ацетатом, Купруму сульфатом і раундапом.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Нетюхайло Л. Г. Активні форми кисню (Огляд літератури) / Л. Г. Нетюхайло, С. В. Харченко // Молодий вчений. – 2014. – № 9 (12). – С. 131–135.

2. Ray P. D. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling / P. D. Ray, B. W. Huang, Y. Tsuji // *Cell Signal.* – 2012. – No. 24. – P. 981–990. DOI: 10.1016/j.cellsig.2012.01.008.

3. Antioxidant intake and antitumor therapy: Toward nutritional recommendations for optimal results / N. Mut-Salud, P. J. Álvarez, J. M. Garrido [et al.] // *Oxid. Med. Cell. Longev.* – 2016. – 6719534. DOI: 10.1155/2016/6719534.

4. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions / S. Di Meo, T. T. Reed, P. Venditti, V. M. Victor // *Oxid Med Cell Longev.* – 2016. – 1245049. DOI: 10.1155/2016/1245049.

5. Ahamed M. Environmental lead toxicity and nutritional factors / M. Ahamed, M. K. J. Siddiqui // *Clin. Nutr.* – 2007. – **26** (4). – P. 400–408.

6. Марушко Ю. В. Значення недостатності вмісту міді в організмі для клінічної практики / Ю. В. Марушко // *Дитячий лікар.* – 2013. – № 2 (23). – С. 11–16.

7. Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance copper compounds copper(I), copper(II) variants namely copper hydroxide, copper oxychloride, tribasic copper sulfate, copper(I) oxide, Bordeaux mixture / Maria Arena, Domenica Auteri, Stefania Barmaz [et al.] // *EFSA Journal.* – 2018. – No. 16 (1). – P. 1–25. DOI: 10.2903/j.efsa.2018.5152.

8. Prasher D. Heavy metals and noise exposure: health effects / D. Prasher // *Noise Health.* – 2009. – **11**. – P. 141–144.

9. Karrari P. A systematic review on status of lead pollution and toxicity in Iran; Guidance for preventive measures / P. Karrari, O. Mehrpour, M. Abdollahi // *Daru.* – 2012. – **20**, No. 1. – P. 2–12.

10. Dietert R. R. Lead and immune function / R. R. Dietert, M. S. Piepenbrink // *Crit. Rev. Toxicol.* – 2006 – No. 36. – P. 359–385.

11. Вплив свинцю на репродуктивне здоров'я чоловіків / С. С. Островська, В. Ф. Шаторна, О. Г. Слесаренко [та ін.] // *Укр. журн. медицини, біології та спорту.* – 2021. – **6**, № 4 (32). – С. 193–198.

12. Mishra D. Quercetin administration during chelation therapy protects arsenic induced oxidative stress in mouse / D. Mishra // *Biol. Trace Elem. Res.* – 2008. – **122**. – P. 137–147.

13. Chelators as antidotes of metal toxicity: therapeutic and experimental aspects / M. Blanusa, V. M. Varnai, M. Piasek [et al.] // *Current Medicinal Chemistry.* – 2005. – **12**, No. 23. – P. 2771–2794.

14. Combinational chelation therapy abrogates lead induced neurodegeneration in rats / P. Pachauri, G. Saxena, A. Mehta [et al.] // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2009. – No. 240. – P. 255–265.

15. Peptides, solid-phase synthesis and characterization: Tailor-made methodologies / F. Guzmán, M. Aróstica, T. Román [et al.] // *Electron J Biotechnol.* – 2023. – 64. DOI: 10.1016/j.ejbt.2023.01.005.

16. Методи оцінки антиоксидантних властивостей фізіологічно активних сполук при ініціюванні вільнорадикальних процесів у досліджах in vitro : метод. рек. / [Ю. І. Губський, В. В. Дунаєв, І. Ф. Беленічев та ін.]. – К. : ДФЦ МОЗ України, 2002. – 26 с.

17. Aging and aging-related diseases: from molecular mechanisms to interventions and treatments / J. Guo, X. Huang, L. Dou [et al.] // *Sig Transduct Target Ther.* – 2022. – 7, 391. DOI: 10.1038/s41392-022-01251-0.

18. Мецишен І. Ф. Метод кількісного визначення HS-груп у крові / І. Ф. Мецишен, Н. П. Григор'єва // *Буковин. мед. вісн.* – 2002. – № 6 (2). – С. 190–192.

19. Геруш І. В. Вплив спиртової настоянки ехінацеї пурпурової на стан антиоксидантної системи печінки при експериментальному ерозивно-виразковому ураженні гастродуоденальної зони / І. В. Геруш, І. Ф. Мецишен // *Фармак. вісн.* – 1998. – № 5. – С. 34–37.

20. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині : довідник / [В. В. Влізла, Р. С. Федорук, І. Б. Ратич та ін.] ; за ред. В. В. Влізла. – Львів : СПЛОМ, 2012. – 764 с.

21. Superoxide dismutases and superoxide reductases / Y. Sheng, I. A. Abreu, D. E. Cabelli [et al.] // *Chem. Rev.* – 2014. – **114**. – P. 3854–3918.

22. Goth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range / L. Goth // *Clinica Chimica Acta.* – 1991. – **196**, No. 2–3. – P. 143–151.

23. Про захист тварин від жорстокого поводження : Закон України від 21.02.2006 р. № 3447-IV.

24. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Ю. М. Кожем'якін, О. С. Хромов, М. А. Філоненко, Г. А. Сайфетдінова. – К. : Авіцена, 2002. – 156 с.

25. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. – Council of Europe. Strasbourg, 1986. – No. 123. – 52 p.

26. Bernard Rosner. *Fundamentals of Biostatistics.* – Boston, USA. – 2010. – 859 p.

27. Failure of recovery from lead induced hepatotoxicity and disruption of erythrocyte antioxidant defence system in wistar rats / T. O. Omobowale, A. A. Oyagbemi,

REFERENCES

1. Netiykhailo, L.H., & Kharchenko, S.V. (2014). Aktyvni formy kysniu (ohliad literatury) [Active forms of oxygen (Literature overview)]. *Molodyi vchenyi – Young Scientist*, 9 (12), 131-135 [in Ukrainian].
2. Ray, P.D., Huang, B.W., Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal*. 24, 981-990. DOI: 10.1016/j.cellsig.2012.01.008.
3. Mut-Salud, N., Álvarez, P.J., Garrido, J.M., & Rodríguez-Serrano, F. (2016) Antioxidant intake and antitumor therapy: Toward nutritional recommendations for optimal results. *Oxid. Med. Cell. Longev*. 2016, 6719534. DOI: 10.1155/2016/6719534.
4. Di Meo, S., Reed, T.T., Venditti, P., Victor, V.M. (2016). Role of ROS and RNS sources in physiological and pathological conditions. *Oxid Med Cell Longev*. 2016, 1245049. DOI: 10.1155/2016/1245049 1245049.
5. Ahamed, M., Siddiqui, M.K.J. (2007). Environmental lead toxicity and nutritional factors. Environmental lead toxicity and nutritional factors. *Clin. Nutr.*, 26 (4), 400-408.
6. Marushko, Iu.V. (2013). Significance of insufficient copper content in the body for clinical practice. *Children's Doctor*, 2 (23), 11-16 [in Ukrainian].
7. Arena, M., Auteri, D., Barmaz, S. & Villamar-Bouza, L. (2018). Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance copper compounds copper(I), copper(II) variants namely copper hydroxide, copper oxychloride, tribasic copper sulfate, copper(I) oxide, Bordeaux mixture. *EFSA Journal*, 16 (1), 1-25. DOI: 10.2903/j.efsa.2018.5152.
8. Prasher, D. (2009). Heavy metals and noise exposure: health effects. *Noise Health*, 11, 141-144.
9. Karrari, P., Mehrpour, O., Abdollahi, M. (2012). A systematic review on status of lead pollution and toxicity in Iran; Guidance for preventive measures. *Daru*. 20, 1, 2-12.
10. Dietert, R.R., & Piepenbrink, M.S. (2006) Lead and immune function. *Crit. Rev. Toxicol.*, 36, 359-385.
11. Ostrovska, S.S., Shatorna, V.F., & Slesarenko, O.H. (2021). The influence of lead on the reproductive health of men. *Ukrainian Journal of Medicine, Biology and Sports*, 6, 4 (32), 193-198 [in Ukrainian].
12. Mishra, D. (2008). Quercetin administration during chelation therapy protects arsenic induced oxidative stress in mouse. *Biological Trace Element Research*, 122, 137-147.
13. Blanus, M. (2005). Chelators as antidotes of metal toxicity: therapeutic and experimental aspects. *Current Medicinal Chemistry*, 12, 2771-2794.
14. Pachauri, P. (2009). Combinational chelation therapy abrogates lead induced neurodegeneration in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 240, 255-265.
15. Guzmán, F., Aróstica, M., & Román, T. (2023). Peptides, solid-phase synthesis and characterization: Tailor-made methodologies. *Electron J Biotechnol*. 64. DOI: 10.1016/j.ejbt.2023.01.005.
16. Hubskeyi, Yu.I., Dunaiev, V.V., & Bielenichev, I.F. (2002). Metody otsinky antyoksydantnykh vlastyvostei fiziologichno aktyvnykh spolkuk pry initsiuванні vilno-radykalnykh protsesiv u doslidakh in vitro: Metod. rekom. Kyiv: DFTs MOZ Ukrainy, Methodical recommend. Kyiv: State Department of the Ministry of Health of Ukraine, 26 [in Ukrainian].
17. Guo, J., Huang, X., & Dou, L. (2022). Aging and aging-related diseases: from molecular mechanisms to interventions and treatments. *Sig Transduct Target Ther* 7, 391, DOI: 10.1038/s41392-022-01251-0.
18. Meschyshen, I.F., & Hryhorieva, N.P. (2002). Method for quantitative determination of HS groups in the blood. *Bukovyna Medical Bulletin*, 6 (2), 190-192 [in Ukrainian].
19. Herush, I.V., & Meschyshen, I.F. (1998). The effect of alcohol tincture of Echinacea purpurea on the state of the antioxidant system of the liver in experimental erosive-ulcerative lesions of the gastroduodenal zone. *Pharma-cological Bulletin*, 5, 34-37 [in Ukrainian].
20. Vlizlo, V.V., Fedorchuk, R.S., & Ratych, I.B. (2012). *Laboratory research methods in biology, animal husbandry and veterinary medicine: Handbook*. Lviv: SPOLOM [in Ukrainian].
21. Sheng, Y., Abreu, I.A., & Cabelli, D.E. (2014). Superoxide dismutases and superoxide reductases. *Chem. Rev.*, 114, 3854-3918.
22. Goth, L. (1991). A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica Chimica Acta.*, 196 (2-3), 143-151.
23. *The Law of Ukraine "On the Protection of animals from ill-treatment" of 02.21. 006, No. 3447* [in Ukrainian].
24. Kozhemiakin, Yu.M., Khromova, O.S., & Filonenko, M.A. (2002). *Scientific and practical recommendations for the maintenance of laboratory animals and work with them*. Kyiv: Avitsena [in Ukrainian].
25. (1986). *European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes Council of Europe*. Strasbourg.
26. Rosner, B. (2010). *Fundamentals of Biostatistics*. Boston, USA.
27. Omobowale, T.O, Oyagbemi, A.A, & Olopade, J.O. (2014). Failure of recovery from lead induced hepatotoxicity and disruption of erythrocyte antioxidant defence system in Wistar rats. *Environ. Toxicol. Pharm.*, 37 (3), 1202-1211.
28. Ahamed, M., & Siddiqui, M.K.J. (2007). Environmental lead toxicity and nutritional factors. *Clin. Nutr.*, 26 (4), 400-408.

Отримано 16.05.2024

Адреса для листування: Є. Б. Дмухальська, Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, майдан Воли, 1, Тернопіль, 46001, Україна, e-mail: dmukhalska@tdmu.edu.ua.

THE CORRECTIVE EFFECT OF PEPTIDES ON THE PRO- AND ANTIOXIDANT SYSTEM INDICATORS' CHANGES IN RATS OF DIFFERENT AGES AFFECTED BY HEAVY METALS AND GLYPHOSATE

Summary

Introduction. It is known that the effects of various environmental pollutants, such as heavy metals and organophosphorus compounds, cause various changes in the human body, accompanied by imbalances between oxidation and reduction, the formation of reactive oxygen species, which explains the development of oxidative stress. Heavy metals and organophosphorus compounds used in agriculture cause diseases of the liver and other organs, which contributes to the formation of reactive oxygen species (ROS), which can induce lipid peroxidation and inhibit the antioxidant system. The basis of the action of heavy metals is the blocking of functionally active groups of structural proteins, enzyme proteins, the blocking of sulfhydryl (thiol, SH) groups is of greatest importance. Under the action of heavy metals, most proteins lose their physicochemical and biological properties, which leads to disruption of protein and other metabolism. To date, the correction of violations of free radical and antioxidant processes by the combined action of heavy metals and organophosphorus pesticides remains incompletely studied.

The aim of the study – to study the antioxidant activity (AOA) of the peptides *in vitro* and *in vivo* in rats of various ages affected by lead acetate, cuprum sulfate, and glyphosate (in the form of roundup herbicide).

Research Methods. Experiments were conducted on laboratory non-linear white male rats of three age groups (sexually immature, sexually mature and old), which were administered intragastrically for 30 days with aqueous solutions of lead acetate, copper sulfate and glyphosate. For the purpose of correction, on the 21st day, 6 hours after the introduction of toxicants, peptides were administered for 10 days. Glutathione peroxidase, glutathione reductase, catalase, superoxide dismutase activity and the content of SH-groups, ROS, TBA-active products (TBA-AP) and diene conjugates (DC) were determined spectrophotometrically in blood serum and liver homogenate of affected and treated animals.

Results and Discussion. Heavy metals and organophosphorus compounds caused the formation of ROS, such as superoxide ions, hydrogen peroxide and hydroxyl radicals. With the combined action of lead acetate, copper sulfate, and glyphosate, the processes of free radical oxidation of lipids and the generation of ROS in rats were activated with age, which was evidenced by the increase in the content of DC, TBA-AP, superoxide anion radical, and hydroxyl radical. As our studies showed, the introduction of toxicants led to a decrease in glutathione peroxidase, glutathione reductase, catalase, superoxide dismutase activity, the level of SH-groups in blood serum and liver homogenate of affected animals. The use of peptides as correction factors contributed to a decrease towards the norm in the content of ROS and products of lipid peroxidation and normalization of the activity of enzymes of the antioxidant system, which obviously indicates the antioxidant and chelating properties of peptides.

Conclusion. Exposure of rats to lead acetate, copper sulfate and glyphosate at a dose of 1/20 LD50 leads to an increase in the content of TBA-AP, DC, ROS and a decrease in the activity of enzymes of the antioxidant system in blood serum and liver homogenate. Administration of peptides as corrective factors to animals of various ages with toxic liver damage increases glutathione peroxidase, glutathione reductase, catalase, and superoxide dismutase activity toward normal levels and reduces the content of lipid free radical oxidation products and ROS.

KEY WORDS: Lead acetate; Copper sulfate; glyphosate; oxidative stress; antioxidant systems.