УДК 612.015.11.062:577
DOI

Є. Б. Дмухальська, Я. І. Гонський
ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І. Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО

ВПЛИВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ, ФОСФОРОРГАНІЧНИХ ПЕСТИЦИДІВ І ПЕПТИДУ НА АКТИВНІСТЬ ФЕРМЕНТІВ ГЛУТАТІОНОВОЇ СИСТЕМИ

Досліджено вміст відновленого глутатіону та активність ферментів метаболізму глутатіону в органах і плазмі крові щурів за умов дії плюмбум ацетату, купрум сульфату й гліфосату в формі раундапу. Під впливом важких металів та гліфосату знижуються активність глутатіонпероксидази і глутатіонредуктази та концентрація глутатіону. Встановлено, що пептид проявляє антиоксидантну активність, про що свідчить відновлення активності ферментів антиоксидантної системи і вмісту глутатіону.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **глутатіон, ферменти метаболізму глутатіону, важкі метали, пептид.**

ВСТУП. Насичення клітин киснем та проходження окисно-відновних реакцій у живих організмах супроводжуються генерацією активних форм кисню (АФК). До АФК належать вільні радикали, продукти неповного відновлення атомарного кисню, а також пероксид водню, синглетний кисень, озон, гіпохлорит, пероксинітрит [3, 4, 7].

Високореакційні АФК взаємодіють із різними компонентами клітини: ліпідами, активуючи їх пероксидне окиснення; ДНК, викликаючи розриви в молекулі та точкові мутації; білками, утворюючи ковалентні зв'язки з окремими функціональними групами білків, що приводить до їх полімеризації та руйнування амінокислотних залишків, особливо тих, які містять SH- і NH-групи, тощо [9].

У живому організмі існує ціла система протидії активним формам кисню – антиоксидантна система організму, що захищає його системи і клітини від ушкодження вільними радикалами [4]. Важливою ланкою в системі антиоксидантного захисту є глутатіонова система, що містить неферментативну (глутатіон (GSH)) і ферментативну (глутатіонпероксидаза (ГП), глутатіонредуктаза (ГР), глутатіонтрансфераза (ГТ)) частини, які нейтралізують вільні радикали та запобігають їх подальшому утворенню [11]. Глутатіонпероксидаза каталізує реакцію окиснення глутатіону, в процесі якого відбувається знешкодження вільних радикалів. Високу концентрацію відновленого глутатіону в крові підтримує глутатіонредуктаза, яка є важливим регулятором антиоксидантного потенціалу організму [17–19].

За умов сучасного екологічного оточення організм зазнає впливу різноманітних екоантропогенних чинників. Серед останніх важливе місце посідають солі важких металів, отрутохімікати і мінеральні добрива, які широко застосовують у господарстві [1, 2, 6]. Пестициди, як і іони важких металів, здатні накопичуватися в організмі, пригнічувати функції систем, викликати морфологічні порушення органів і тканин [6, 10, 12, 15].

Тому метою даної роботи було дослідити активність ферментів глутатіонової системи та вміст глутатіону в тканинах щурів, уражених купрум сульфатом, плюмбум ацетатом та пестицидом гліфосатом.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проводили на лабораторних нелінійних білих щурах-самцях трьох вікових періодів: статевого дозрівання (молоді масою 70–90 г і віком 2–3 міс.), статевої зрілості (середні масою 170–210 г і віком 5–8 міс.) та старіння, в яких процеси катаболізму переважали над процесами анаболізму (масою 250–300 г і віком 20–24 міс.). Вік щурів визначали за схемою [14].

Субхронічне ураження щурів моделювали шляхом щоденного, впродовж 30 діб, перорального введення водних розчинів плюмбум ацета-

© Є. Б. Дмухальська, Я. І. Гонський, 2016.

ту в дозі 11 мг/кг маси тіла (1/20 LD_{50}), купрум сульфату в дозі 13 мг/кг маси тіла (1/20 LD_{50}), гліфосату (у формі гербіциду раундапу) в дозі 250 мг/кг маси тіла (1/20 LD_{50}). Токсиканти вводили у комбінації та окремо. Інтактним тваринам вводили питну водопровідну дехлоровану воду. З метою корекції виявлених порушень на 20 день експерименту через 6 год після введення токсикантів щодня, протягом 10 днів, вводили внутрішньошлунково пептид цистеіл-гістидил-тирозил-гістидил-ізолейцин у дозі 9 мг/кг маси тіла (концентрація амінокислот у крові). Пептид синтезовано на кафедрі супрамолекулярної хімії та біохімії Інституту високих технологій Київського національного університету ім. Т. Шевченка.

Усіх піддослідних тварин було поділено на три групи: 1-ша – інтактні (контрольні); 2-га – уражені купрум сульфатом, плюмбум ацетатом та гліфосатом (раундапом) у поєднанні; 3-тя – з корекцією пептидом. На 31 добу після останнього введення ксенобіотиків та чинників корекції щурів виводили з експерименту за умов тіопентал-натрієвого наркозу.

Вміст GSH визначали за реакцією з 5,5-дитіобіс-2-нітробензойною кислотою [5], активність ГП – за кількістю НАДФН, що утворюється під час окиснення глутатіону [16], активність ГР – за світлопоглинанням при 340 нм [19].

Під час виконання досліджень усі тварини перебували у віварії за умов підтримки постійної температури та вологості. Утримували щурів і проводили всі експерименти відповідно до національних та міжнародних рекомендацій щодо гуманного поводження з лабораторними тваринами, зокрема Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986) [8].

Отриманий цифровий матеріал піддавали статистичному аналізу з використанням t-критерію Стьюдента [13], обробку результатів виконано у відділі системних статистичних досліджень Тернопільського державного медичного університету імені І. Я. Горбачевського в програмному пакеті Statsoft STATISTICA.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Відомо, що дія на організм хімічних агентів супроводжується посиленням процесів вільнорадикального окиснення і змінами антиоксидантів у клітинах організму.

Результати досліджень показали, що з віком у крові та печінці інтактних тварин знижувався вміст відновленого глутатіону (табл. 1, 2). Найнижчі показники зафіксовано в старих (24-місячних) тварин: у крові – (4,91±0,08) ммоль/л, у печінці – (5,65±0,08) ммоль/л. Такі зміни можна розглядати як вікові особливості метаболізму, пов'язані з посиленим використанням антиоксидантів на знешкодження вільних радикалів, вміст яких з віком зростає. При такому зниженні концентрації неферментативних антиоксидантів підвищується активність деяких ферментів, що, очевидно, свідчить про компенсаторну і захисну реакції організму.

Дані щодо глутатіонової системи наведено в таблицях 1 і 2. Вміст GSH та активність ГП і ГР у крові та печінці щурів усіх вікових груп за комбінованого ураження плюмбум ацетатом, купрум сульфатом і гліфосатом достовірно знижувалися порівняно з нормою (інтактні тварини). Мінімальне значення активності ГР і ГП у крові спостерігали в статевонезрілих щурів. Активність даних показників у тварин 3-місячного віку була суттєво нижчою, ніж у щурів 6- та 24-місячного віку, і становила 53,6 та 54,4 % відповідно від рівня інтактних тварин.

Щодо активності ГП у печінці, то у тварин 24-місячного віку вона була мінімальною і становила 46,9 % від рівня інтактних. Найбільшого зниження активності зазнала ГР у печінці 3-місячних щурів, вона складала 46,2 % від рівня інтактних. Такі зміни даних показників можна пояснити тим, що солі плюмбуму і купруму в комбінації з фосфорорганічним пестицидом сприяють підвищенню процесів пероксидного окиснення, тому на нейтралізацію його вільнорадикальних продуктів витрачаються неферментативні та ферментативні антиоксиданти.

Досліджувані ксенобіотики викликали зменшення вмісту GSH у крові та печінці, мінімальне значення GSH спостерігали в сироватці крові (64,8 % від рівня інтактних) та гомогенаті печінки (56,4 % від рівня контролю) тварин 3-місячного віку. Таке істотне зниження вмісту відновленого глутатіону в крові та печінці, можливо, пов'язане з тим, що іони плюмбуму є тіоловою отрутою і, взаємодіючи з білками, знижують його токсичність, що проявляється пригніченням функцій білків, у тому числі ферментів з антиоксидантними властивостями.

Для корекції порушень антиоксидантної системи та відновлення динамічної рівноваги між антиоксидантною і прооксидантною системами було використано пептид цистеіл-гістидил-тирозил-гістидил-ізолейцин. Введення ураженим щурам пептиду сприяло нормалізації активності ферментів глутатіонової системи та вмісту глутатіону. Найкращий коригувальний ефект пептид проявив на показники старих щурів. Результати досліджень вказують на антиоксидантні властивості пептиду.

Таблиця 1 – **Вміст відновленого глутатіону (ммоль/л), активність глутатіонпероксидази (мкмоль/(хв·г білка)) і глутатіонредуктази (мкмоль/(хв·г білка)) в сироватці крові щурів за умов тривалого введення купрум сульфату, плюмбум ацетату, гліфосату (в формі раундапу) та при корекції пептидом (M±m, n=10)**

Показник	Група тварин		
	інтактні	уражені	з корекцією
Статевонезрілі			
GSH, ммоль/л	6,10±0,08	3,95±0,05*	6,09±0,07**
ГР, мкмоль/(хв·г білка)	17,8±0,7	9,5±0,4*	17,6±0,5**
ГП, мкмоль/(хв·г білка)	46,9±0,8	25,5±1,2*	46,8±0,9**
Статевозрілі			
GSH, ммоль/л	5,87±0,07	4,02±0,06*	5,85±0,08
ГР, мкмоль/(хв·г білка)	15,3±,6	9,4±0,5*	14,8±0,4**
ГП, мкмоль/(хв·г білка)	42,9±0,7	26,4±0,9*	42,6±0,8**
Старі			
GSH, ммоль/л	5,65±0,08	4,00±0,07*	5,58±0,07**
ГР, мкмоль/(хв·г білка)	12,9±0,5	6,5±0,5*	12,2±0,5**
ГП, мкмоль/(хв·г білка)	35,7±0,7	21,1±0,9*	35,6±0,7**

Примітка. Тут і в таблиці 2: * – результати достовірні щодо інтактних тварин ($p<0,05$); ** – результати достовірні щодо показників щурів за комбінованого ураження ($p<0,05$).

Таблиця 2 – **Вміст відновленого глутатіону (ммоль/л), активність глутатіонпероксидази (мкмоль/(хв·г білка)) і глутатіонредуктази (мкмоль/(хв·г білка)) в гомогенатах печінки щурів за умов тривалого введення купрум сульфату, плюмбум ацетату, гліфосату (в формі раундапу) та при корекції пептидом (M±m, n=10)**

Показник	Група тварин		
	інтактні	уражені	з корекцією
Статевонезрілі			
GSH, ммоль/л	5,64±0,07	3,63±0,07*	5,45±0,07**
ГР, мкмоль/(хв·г білка)	10,4±0,4	4,8±0,3*	10,1±0,5**
ГП, мкмоль/(хв·г білка)	15,3±0,6	7,6±0,5*	15,0±0,5**
Статевозрілі			
GSH, ммоль/л	5,22±0,09	4,23±0,08*	5,07±0,04**
ГР, мкмоль/(хв·г білка)	9,2±0,5	5,4±0,3*	9,0±0,4**
ГП, мкмоль/(хв·г білка)	12,9±0,5	6,5±0,4*	12,7±0,5**
Старі			
GSH, ммоль/л	4,91±0,08	3,73±0,08*	4,84±0,08**
ГР, мкмоль/(хв·г білка)	7,8±0,4	4,2±0,2*	7,6±0,4**
ГП, мкмоль/(хв·г білка)	9,8±0,6	4,6±0,3*	9,4±0,6**

ВИСНОВКИ. 1. 30-денна інтоксикація купрум сульфатом, плюмбум ацетатом та гліфосатом у формі раундапу в допорогових дозах (1/20 LD_{50}) супроводжується пригніченням антиоксидантної системи, про що свідчить зменшення вмісту відновленого глутатіону, та пригніченням активності ферментів глутатіонової системи як у сироватці крові, так і в гомогенаті печінки.

2. Використання пептиду цистеіл-гістидил-тирозил-гістидил-ізолейцин сприяє нормалізації досліджуваних показників.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Аксенова М. Е. Тяжелые металлы: механизмы нефротоксичности (обзор литературы) / М. Е. Аксенова // Нефрология и диализ. – 2000. – **2**, № 1–2. – С. 56–58.

2. Гігієнічна класифікація пестицидів за ступенем небезпечності / ДСанПіН 8.87.1.002. – К., 1998. – 181 с.

3. Губерук В. О. Перекисне окиснення ліпідів та антиоксидантна система захисту організму (огляд літератури) / В. О. Губерук // Наук. вісн. Львівського НУВМБТ ім. С. З. Гжицького. – 2008. – **10**, № 3 (38), ч. 1. – С. 51–55.

4. Данчук В. В. Пероксидне окиснення у сільськогосподарських тварин і птиці / В. В. Данчук. – Кам'янець-Подільський : Абетка, 2006. – 192 с.

5. Горячковский А. М. Клиническая биохимия / А. М. Горячковский. – Одесса : Астропринт, 1998. – 608 с.

6. Доповнення до переліку пестицидів та агрохімікатів, дозволених до використання в Україні / Міністерство охорони навколишнього природного середовища. – К., 2009. – 304 с.

7. Заворотная Р. М. Синглетный кислород при лечении ряда патологических процесов: физико-химические аспекты / Р. М. Заворотная // Укр. ревматол. журн. – 2002. – № 1. – С. 35–37.

8. 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.

9. Копытова Т. В. Окислительная модификация белков и олигопептидов у больных хроническими дерматозами с синдромом эндогенной интоксикации / Т. В. Копытова, О. Н. Дмитриева, Л. Н. Химкина // Фундаментал. исследования. – 2009. – № 6. – С. 25–29.

10. Свинец и его действие на организм (обзор литературы) / А. И. Корбакова, Н. С. Сорокина, Н. Н. Молодкина [и др.] // Медицина труда и промышленная экология. – 2001. – № 5. – С. 29–34.

11. Коржов В. И. Роль системы глутатиона в процессах детоксикации и антиоксидантной защиты / В. И. Коржов, В. Н. Жадан, М. В. Коржов // Журн. Академії медичних наук України. – 2007. – **13**, № 1. – С. 3–20.

12. Кузнецова Е. М. Глифосат: поведение в окружающей среде и уровни остатков / Е. М. Кузнецова, В. Д. Чмиль // Совр. пробл. токсикол. – 2010. – № 1. – С. 87–95.

13. Лакин Г. Ф. Биометрия / под ред. Г. Ф. Лакина. – М. : Высшая школа, 1990. – 352 с.

14. Махинько В. И. Константы роста и функциональные периоды развития в постнатальной жизни белых крыс / В. И. Махинько, В. Н. Никитин // Молекулярные и физиологические механизмы возрастного развития. – К., 1975. – С. 308–326.

15. Влияние карнозина и его N-ацетильного производного на стабильность эритроцитов больных алкоголизмом в состоянии абстиненции / В. Д. Прокопьева, А. А. Бохан, П. Джонсон, А. А. Болдырев // Вопр. мед. химии. – 1998. – № 5. – С. 474–478.

16. Прохорова М. И. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) : учеб. пособ. / под ред. М. И. Прохоровой. – Л. : Изд-во Ленинград. ун-та, 1982. – 272 с.

17. Старик Л. І. Антиоксидантна система: природа, склад, механізми гомеостазу (огляд літератури) / Л. І. Старик // Наук. вісн. Львівської НАВМ ім. С. З. Гжицького. – 2007. – **9**, № 3 (34), ч. 2. – С. 172–177.

18. Frei B. Content of antioxidants, preformed lipid hydroperoxids and cholesterol as predictors of the susceptibility of human LDL to metalion-dependent and independent oxidation / B. Frei, J. M. Gaziano // J. Lipid Res. – 1993. – **34**. – P. 2135–2145.

19. Howard S. A. The relative effectiveness of human plasma glutathione peroxidase as a catalyst for the reduction of hydroperoxides by glutathione / S. A. Howard, W. C. Hawkes // Biol. Trace Element Res. – 1998. – **61**. – P. 127–136.

Е. Б. Дмухальская, Я. И. Гонский

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

ВЛИЯНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ, ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ ПЕСТИЦИДОВ И ПЕПТИДА НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ГЛУТАТИОНОВОЙ СИСТЕМЫ

Резюме

Исследовано содержание восстановленного глутатиона и активность ферментов метаболизма глутатиона в органах и плазме крови крыс в условиях действия ацетата свинца, сульфата меди и глифосата в форме раундапа. Под влиянием тяжелых металлов и глифосата снижаются активность глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы и концентрация глутатиона. Установлено, что пептид проявляет антиоксидантную активность, о чем свидетельствует восстановление активности ферментов антиоксидантной системы и содержания глутатиона.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **глутатион, ферменты метаболизма глутатиона, тяжелые металлы, пептид.**

Ye. B. Dmukhalska, Ya. I. Honsky
I. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

THE INFLUENCE OF HEAVY METALS, ORGANOPHOSPHATE PESTICIDES AND PEPTIDES ON THE ENZYME ACTIVITY OF GLUTATHIONE SYSTEM

Summary

The reduced glutathione content and the glutathione metabolism enzymes activity in organs and blood plasma of rats under conditions of lead acetate, copper sulphate and glyphosate in Roundup form were studied. The glutathioneperoxidase, the glutathionereductase activity and the concentration of glutathione decreases during action of heavy metals and glyphosate. It was found out that peptide exhibits antioxidant activity, the correction of the peptide and glutathione content.

KEY WORDS: **glutathione, glutathione metabolism enzymes, heavy metals, peptide.**

Отримано 26.02.16

Адреса для листування: *Є. Б. Дмухальська, Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського, м. Волі, 1, Тернопіль, 46001, Україна.*