

СТАН АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ ТА ЖОВЧОУТВОРЮВАЛЬНОЇ ФУНКЦІЇ В ОРГАНІЗМІ ЩУРІВ, УРАЖЕНИХ СПОЛУКАМИ ШЕСТИВАЛЕНТНОГО ХРОМУ

Ураження щурів різного віку біхроматом калію (3 мг/кг) призвело до порушення антиоксидантної системи організму. Це підтвердилося зниженням активності каталази і вмісту відновленого глутатіону в сироватці крові та печінці піддослідних тварин. Найбільш чутливими до процесів жовчоутворення під дією $K_2Cr_2O_7$ виявилися статевонезрілі та старі тварини.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: антиоксидантна система, жовчоутворення, печінка, шестивалентний хром.

ВСТУП. Сполуки важких металів є одним із найбільш розповсюджених хімічних факторів професійного ризику за умов сучасної промисловості [1]. Найбільше зацікавлення викликають метали, які широко застосовують у виробничій діяльності, зокрема хром [2, 3].

Згідно з літературними джерелами [4, 5], сполуки шестивалентного хрому використовують на підприємствах кольорової металургії, хімічної та лакофарбової промисловості, текстильних і шкіряних заводах. Зокрема, хромат плюмбуму та хромат кальцію використовують як барвники для фарбування шкіри. Дихромат натрію і хромокислий барій застосовують як інгібітори корозії. Технічний біхромат калію використовують для виробництва сірників, сухих батарей, неорганічних пігментів, лакофарбових покриттів, а також в органічному синтезі – для отримання різних хімічних сполук [6, 7].

У низці робіт [3, 8] показано, що шкідливий вплив хрому (VI) на організм зумовлений утворенням активних форм кисню (АФО) під час відновлення Cr^{6+} у клітинах. Відомо, що збільшення інтенсивності утворення АФО в клітинах за певних умов може призводити до розвитку оксидативного стресу, який лежить в основі багатьох захворювань [6]. У зв'язку з потенційною загрозою, яку створюють реакційноздатні метаболіти кисню, в живих системах функціонує система захисту від дії надлишку АФО, до якої належать низькомолекулярні ферментні антиоксиданти та ферменти-антиоксиданти [9].

© Н. І. Бурмас, 2016.

З огляду на зростання темпів забруднення навколишнього середовища ксенобіотиками, важливо вивчити їх дію на організм людини. Тому дослідження токсичної дії сполук шестивалентного хрому є актуальним питанням сучасної біології та медицини.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди проведені на білих безпородних щурах-самцях трьох вікових періодів: статевого дозрівання (3-місячні тварини масою 90–110 г), статевої зрілості (6-місячні тварини масою 150–170 г) та старіння (18-місячні тварини масою 280–300 г), яких утримували на стандартному раціоні віварію Тернопільського державного медичного університету імені І. Я. Горбачевського.

Утримували щурів і проводили маніпуляції з ними згідно з положеннями статті 26 Закону України від 21.02.2006 р. № 3447-IV “Про захист тварин від жорстокого поводження”, Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей, Загальних етичних принципів експериментів на тваринах, затверджених 20.09.2001 р. на I Українському національному конгресі з біоетики, та з урахуванням положень, викладених у NIH Guide for the care and use of laboratory animals [10].

Моделлю токсичного ураження щурів слугувала інтоксикація шестивалентним хромом, який вводили тваринам щодоби внутрішньошлунково протягом 7-ми і 14-ти діб у формі розчину біхромату калію в дозі 3 мг/кг [6]. Усі токсиканти вводи-

ли зранку, до приймання їжі, 1 раз на добу. Тварин виводили з експерименту за допомогою тіопенталу натрію на 7-му та 14-ту доби після останнього введення. Досліджували гомогенат печінки та сироватку крові щурів. Із серця тварин забирали кров, яку центрифугували при 3000 об./хв протягом 15 хв. Отриману сироватку крові (надосадову рідину) використовували для проведення досліджень. Відібрану печінку (250 мг) застосовували для одержання 10 % гомогенату методом диференційного гомогенізування, яке проводили після попередньої перфузії з фізіологічним розчином. Усіх піддослідних тварин кожного вікового періоду було поділено на дві групи: 1-ша – щури контрольної групи (вводили фізіологічний розчин); 2-га – тварини, отруєні розчином біхромату калію.

Стан антиоксидантної системи організму тварин оцінювали шляхом визначення її показників – активності каталази [11], вмісту відновленого глутатіону (G-SH) [12] і церулоплазміну (ЦП) [12]. Стан жовчоутворювальної функції печінки щурів оцінювали за вмістом загального білірубину (ЗБ) [12] та жовчних кислот (ЖК) [12] у сироватці крові.

Статистичну обробку отриманих даних проводили на ПК за допомогою програм Microsoft Excel та STATISTICA 6,0 з розрахунку середніх величин, їх похибок, критерію Стюдента [13]. Зміни вважали достовірними при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Згідно з результатами дослідження (табл. 1), встановлено зниження активності каталази в сироватці крові уражених тварин протягом усього експерименту, що призвело до накопичення H_2O_2 , руйнування або модифікації біологічних молекул і, як наслідок, до розпаду клітинних структур, що спричинило загибель клітин.

Наприкінці експерименту (14-та доба) було відмічено достовірне зменшення ($p \leq 0,05$) активності каталази в печінці. Так, у статевонезрілих тварин активність ензиму знизилась на 70 %, у статевозрілих – на 58 % і в старих – на 52 % порівняно з контрольною групою. Очевидно, порушується білоксинтезувальна функція ураженої печінки і вона не спроможна утворювати необхідну кількість даного ензиму.

За умов отруєння тварин різного віку біхроматом калію заслуговувало особливої уваги дослідження в сироватці крові мідьвмісного білка церулоплазміну, якому притаманні ензимні антиоксидантні властивості. Встановлено, що церулоплазмін може вироблятися і макрофагами та лімфоцитами. Посилення його синтезу в окремих органах свідчить про розвиток патологічного процесу в них. Вміст ЦП збільшився вже на 7-му добу дослідження і максимального значення досягнув у старих щурів (251 % порівняно з тваринами інтактного контролю). Отже, отруєння щурів шестивалентним хромом викликало

Таблиця 1 – Показники антиоксидантної системи в організмі щурів, уражених біхроматом калію ($M \pm m$, $n=6$)

Показник	Вікова група тварин								
	статевонезрілі			статевозрілі			старі		
	інтактний контроль	ураження, 7-ма доба	ураження, 14-та доба	інтактний контроль	ураження, 7-ма доба	ураження, 14-та доба	інтактний контроль	ураження, 7-ма доба	ураження, 14-та доба
Активність каталази у сироватці крові, мккат/л	11,70±0,67	9,12±0,51*	8,72±0,55*	21,16±0,28	15,70±0,26*	15,27±0,21*	27,06±1,19	23,71±0,33*	20,07±0,23*
Активність каталази у печінці, мккат/кг	10,55±0,88	3,44±0,44*	3,20±0,27*	14,23±0,33	9,39±0,36*	5,93±0,53*	15,38±0,60	10,57±0,55*	7,35±0,22*
Вміст відновленого глутатіону в сироватці крові, моль/л	0,37±0,02	0,27±0,01*	0,26±0,01*	0,34±0,01	0,25±0,01*	0,24±0,01*	0,66±0,02	0,49±0,02*	0,46±0,02*
Вміст відновленого глутатіону в печінці, ммоль/г	0,28±0,01	0,24±0,01	0,21±0,01*	0,33±0,01	0,22±0,01*	0,17±0,01*	0,55±0,01	0,43±0,01*	0,40±0,02*
Вміст церулоплазміну в сироватці крові, мг/л	4,46±0,38	7,26±0,59*	8,31±0,36*	3,53±0,30	5,91±0,33*	7,44±0,42*	5,76±0,29	14,44±0,67*	18,38±0,85*

Примітка. Тут і в наступній таблиці: * – достовірні зміни між інтактними тваринами та ураженими ($p \leq 0,05$).

підвищення вмісту ЦП, що, можливо, зумовлено миттєвим включенням цього ензиму вже на початкових стадіях ураження у захист організму від дії токсичного фактора.

Поряд із дослідженням активності антиоксидантних ензимів (каталази, церулоплазміну) визначено вміст в організмі тварин відновленого глутатіону, який є структурним компонентом глутатіонової антиоксидантної системи. Вміст G-SH знизився на 25 % у сироватці крові статевонезрілих щурів (табл. 1) через сім діб після останнього введення біхромату калію, а вже наприкінці експерименту він зменшився на 29 % відносно цього показника у тварин інтактного контролю. Різне зниження вмісту відновленого глутатіону в сироватці крові може бути наслідком виснаження в перші дні ураження однієї з найпотужніших антиоксидантних систем організму – глутатіонової.

У печінці статевонезрілих щурів указаний вище показник зменшився при ураженні біхроматом калію на 14 % на 7-му добу експерименту і на 25 % – на 14-ту добу відносно контрольних тварин, у статевозрілих – на 33 і 48 %, у старих – на 22 і 27 % відповідно (табл. 1). Ураження тварин різних вікових груп шестивалентним хромом знижувало рівень G-SH як у сироватці крові, так і в печінці. Очевидно, під дією окисника Cr³⁺ (відновлена форма Cr⁶⁺) відновлений глутатіон окиснюється з утворенням дисульфідного

зв'язку, виконуючи тим самим функцію антиоксиданта.

Зменшення вмісту відновленого глутатіону в печінці уражених тварин зумовило порушення реакції транссульфінації, зниження стійкості гепатоцитів, а також спричинило розвиток холестази та зниження функції транспортних білків і ЖК. З огляду на вищесказане, доцільним було дослідити показники жовчоутворювальної функції в організмі уражених щурів.

Відмічено вірогідне збільшення ($p \leq 0,05$) вмісту ЗБ у сироватці крові тварин усіх вікових груп порівняно з контрольними щурами (табл. 2). Найвищий вміст загального білірубину відзначено наприкінці дослідження у статевонезрілих тварин, і він становив 147 % порівняно з інтактними щурами, що на 15 і 8 % вище цього показника у статевозрілих та старих тварин відповідно. Зростання вмісту загального білірубину під впливом застосованого токсиканта свідчило про руйнування клітинних мембран, зокрема еритроцитів, і зниження їх стійкості до гемолізу, а також про погіршення видільної функції печінки.

Окрім порушення утворення жовчі, яке має місце при токсичних гепатитах, важливим фактором є затримка її відтоку, внаслідок чого розвивається синдром холестази. Це спричинює розвиток холемії, тобто інтоксикацію компонентами жовчі, які проникають у кров, передусім жовчними кислотами і білірубіном [14].

Таблиця 2 – Показники жовчоутворювальної функції в організмі щурів, уражених біхроматом калію ($M \pm m$, $n=6$)

Показник	Вікова група тварин								
	статевонезрілі			статевозрілі			старі		
	інтактний контроль	ураження, 7-ма доба	ураження, 14-та доба	інтактний контроль	ураження, 7-ма доба	ураження, 14-та доба	інтактний контроль	ураження, 7-ма доба	ураження, 14-та доба
Вміст загального білірубину в сироватці крові, мкмоль/л	12,19±0,55	14,82±0,98	17,97±1,13*	12,49±0,47	14,10±0,91	16,53±1,17*	15,09±0,78	19,25±1,27*	20,97±1,61*
Вміст жовчних кислот у сироватці крові, г/л	6,95±0,43	9,36±0,68*	11,16±0,62*	9,48±0,58	14,62±0,54*	16,37±0,67*	12,02±0,64	18,33±0,98*	20,90±0,95*

У таблиці 2 представлено результати дослідження вмісту жовчних кислот у сироватці крові щурів усіх вікових груп. Уже на 7-му добу дослідження цей показник збільшився на 35 % у статевонезрілих тварин, на 53 % – у статевозрілих і на 57 % – у старих відносно щурів інтактного контролю. Аналогічну тенденцію спостерігали на 14-ту добу експерименту при ураженні K₂Cr₂O₇. Найбільший його показник відмічено у старих щурів, він становив (20,90±0,95) г/л, що на 74 % вище норми ((12,02±0,64) г/л).

Отже, в уражених тварин розвивається холемія, яка характеризується накопиченням у крові жовчних кислот, а також загального білірубину й інших компонентів жовчі, які можуть пригнічувати синтез компонентів комплексу в гепатоцитах, інгібувати фагоцитарну активність макрофагів.

ВИСНОВКИ. Після ураження тварин шестивалентним хромом спостерігають значні порушення функціонування антиоксидантної систе-

ми. Відмічене під час дослідження зниження активності каталази як у сироватці крові, так і в печінці піддослідних тварин усіх вікових груп вказує на порушення білоксинтезувальної функції печінки та деградацію білкових молекул за умов токсикозу. Підтвердженням цього є зменшення вмісту відновленого глутатіону в дослідженому матеріалі та збільшення вмісту церулоплазміну в сироватці крові. Зростання вмісту

загального білірубину та жовчних кислот у сироватці крові уражених тварин свідчить про порушення виділення їх гепатоцитами в жовчні капіляри та виникнення холестазу.

Адекватність даної моделі до ураження людей за умов антропогенного забруднення довкілля дасть змогу рекомендувати деякі методи дослідження для оцінки ступеня тяжкості хімічного токсикозу.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Експериментальне вивчення впливу важких металів на організм тварин різних вікових груп / І. М. Трахтенберг, Т. К. Короленко, М. М. Коршун [та ін.] // Гигиена труда : сборник 35. – 2004. – С. 158–170.
2. Изтлеуов М. К. Гомеостаз и хромовая патология / М. К. Изтлеуов. – Актобе, 2003. – 213 с.
3. Сологуб Л. І. Хром в організмі людини і тварин. Біохімічні, імунологічні та екологічні аспекти / Л. І. Сологуб, Г. Л. Антоняк, Н. О. Бабич. – Львів : Євросвіт, 2007. – 127 с.
4. Стефанюк В. Д. Стан секреторної функції шлунка у хворих на виразкову хворобу та хронічний ґастроудоденіт, які контактують із малими концентраціями сполук хрому залежно від професійного стану, віку та статі / В. Д. Стефанюк // Прак. медицина. – 2003. – 9, № 2. – С. 142–146.
5. Is hexavalent chromium carcinogenic via ingestion? A weight-of-evidence review / D. M. Proctor, J. M. Otani, B. L. Finley [et al.] // J. toxicol. environ. health. – 2002. – № 65. – P. 701–746.
6. Хомич Н. Вплив катіонів хрому (VI) на активність ферментів енергетичного метаболізму в гепатоцитах тварин / Н. Хомич, Н. Панас, Г. Антоняк // Вісн. Львів. нац. аграр. ун-ту. – 2010. – № 3. – С. 78–84.
7. Hexavalent chromium ingestion: biological markers of nephrotoxicity and genotoxicity / P. Hantson, O. Van Caenegem, I. Decordier [et al.] // Clin. toxicol. (Phila). – 2005. – 43, № 2. – P. 111–112.
8. Role of chromium (VI) in the chromium (VI) related free radical formation, dG hydroxylation, and DNA damage / H. Lwo, Y. Cu, X. Shi [et al.] // J. inorg. biochem. – 1996. – 64, № 1. – P. 25–35.
9. Шаповал Г. С. Механизмы антиоксидантной защиты организмов при действии активных форм кислорода / Г. С. Шаповал, В. Ф. Громова // Укр. біохім. журн. – 2003. – 75, № 2. – С. 5–13.
10. Guide for the care and use of laboratory animals: Eighth edition. The National Academies Press, Washington, DC. – 2011.
11. Метод определения активности каталазы / М. А. Королук, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова [и др.] // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.
12. Лифшиц В. М. Биохимические анализы в клинике : справочник / В. М. Лифшиц, В. И. Сидельникова. – 5-е изд., перераб. и допол. – М. : Триада-Х, 2002. – 208 с.
13. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. – К. : Морион, 2000. – 320 с.
14. Метаболические аспекты прогнозирования исходов хронического вирусного гепатита / Э. И. Белобородова, И. В. Савченко, Е. В. Белобородова [и др.] // Клинич. медицина. – 2005. – 83, № 2. – С. 53–56.

СОСТОЯНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ И ЖЕЛЧЕОБРАЗОВАТЕЛЬНОЙ ФУНКЦИИ В ОРГАНИЗМЕ КРЫС, ПОРАЖЕННЫХ СОЕДИНЕНИЯМИ ШЕСТИВАЛЕНТНОГО ХРОМА

Резюме

Поражение крыс разного возраста бихроматом калия (3 мг/кг) привело к нарушению антиоксидантной системы организма. Это подтвердилось снижением активности каталазы и содержания восстановленного глутатиона в сыворотке крови и печени экспериментальных животных. Наиболее чувствительными к процессам желчеобразования под действием $K_2Cr_2O_7$ оказались неполовозрелые и старые животные.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: антиоксидантная система, желчеобразование, печень, шестивалентный хром.

N. I. Burmas
I. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

THE STATE OF ANTIOXIDANT SYSTEM AND BILE FORMATION FUNCTION IN THE ORGANISM OF RATS AFFECTED BY HEXAVALENT CHROMIUM COMPOUNDS

Summary

The affection of different age rats by potassium dichromate (3 mg/kg) was led to the violation of antioxidant system. It was confirmed by decrease of the catalase rate and reduced glutathione content in blood serum and liver of experimental animals. The most sensitive animals to the bile formation processes were immature and old animals, affected by $K_2Cr_2O_7$.

KEY WORDS: antioxidant system, bile formation, liver, hexavalent chromium.

Отримано 15.02.16

Адреса для листування: Н. І. Бурмас, Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського, м. Волі, 1, Тернопіль, 46001, Україна.