

ОКСИДАТИВНИЙ СТРЕС У БІЛИХ ЩУРІВ ЗА УМОВ ТОКСИЧНОГО ВПЛИВУ ІОНІВ КАДМІЮ

Вивчено вплив кадмію хлориду на генерацію активних форм кисню. За цих умов підвищуються продукція супероксид-аніон-радикала, швидкість утворення гідроксильного радикала та вміст пероксиду водню. Досліджено стан ферментативної та неферментативної ланок антиоксидантної системи. Виявлено пригнічення активності супероксиддисмутази та зниження концентрації сечової кислоти. Встановлено, що токсичний вплив іонів кадмію викликає оксидативний стрес.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: оксидативний стрес, кадмію хлорид, вільні радикали, антиоксидантна система.

ВСТУП. Токсичність важких металів як широко розповсюджених полютантів зумовлює пильну увагу дослідників щодо забруднення ними навколишнього середовища. При цьому кадмій відносять до найбільш небезпечних важких металів, оскільки він володіє високим кумулятивним ефектом, що не піддається біодеградації, і практично не виводиться з організму [4]. Підвищений вміст кадмію в навколишньому середовищі призводить до зміни інтенсивності та спрямованості багатьох метаболічних процесів у клітині [5]. Зокрема, встановлено, що однією з неспецифічних реакцій на іони кадмію є розвиток у клітинах оксидативного стресу, основу якого складає утворення надмірної кількості активних форм кисню (АФК) [1].

У формуванні стійкості до вільнорадикального пошкодження велика роль належить функціонуванню ферментативної та неферментативної ланок антиоксидантного захисту. Структура ферментів-антиоксидантів передбачає наявність великого числа сульфгідрильних груп, що визначають просторову конформацію протеїнів. Іони кадмію здатні швидко реагувати із SH-групами у водному середовищі, а також заміщувати цинк в активних центрах ферментів, що призводить до порушення їх функціонування. Тому метою даної роботи було виявити вплив іонів кадмію на генерацію активних форм кисню та деякі показники антиоксидантної системи.

© М. В. Кирилів, 2013.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Експериментальні дослідження проводили на білих статевозрілих щурах-самцях масою 180–200 г, яких утримували у віварії на стандартному раціоні. Тварин було поділено на дві групи: 1-ша група – інтактні тварини; 2-га – щури, уражені кадмію хлоридом. Токсичне ураження викликали шляхом одноразового внутрішньошлункового введення щурам водного розчину кадмію хлориду в дозі 7 мг/кг маси тіла тварини [2]. Тварин декапітували під тіопенталовим наркозом на 1-шу, 4-ту, 7-му, 10-ту доби від моменту ураження згідно з правилами Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986) [10]. Дослідженню підлягали плазма крові та печінка.

Продукцію супероксид-аніон-радикала ($O_2^{\cdot-}$) визначали за тестом з нітросинім тетразолієм у печінці зі специфічними індукторами НАДФН і НАДН для оцінки, відповідно, ролі мікросом та мітохондрій у цьому процесі [6]. Швидкість утворення гідроксильного радикала (OH^{\cdot}) вивчали за його здатністю окиснювати 2-дезоксирибозу, що розпадається до малонового діальдегіду. Останній з тіобарбітуровою кислотою дає забарвлений комплекс [9]. Вміст пероксиду водню (H_2O_2) визначали спектрофотометричним методом за знебарвленням перманганату калію при внесенні кислоторозчинної фракції, що містить H_2O_2 [3]. Активність супероксиддисмутази (СОД) [КФ 1.15.1.1] досліджували методом [7], який

полягає у здатності СОД конкурувати з нітросинім тетразолієм за супероксидні аніони, що утворюються в результаті аеробної взаємодії НАДН з феназинметасульфатом. Концентрацію сечової кислоти визначали із застосуванням стандартної добірки реактивів фірми “Філісит Діагностика” (м. Дніпропетровськ).

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з визначенням t-критерію Стьюдента. Для розрахунків використовували комп'ютерну програму Excel (Microsoft, USA).

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. У наукових роботах зустрічаються публікації, в яких ідеться про те, що кадмій не може брати безпосередню участь в утворенні вільних радикалів кисню та азоту, але таке продукування з участю даного металу відбувається опосередковано [13]. Деякі автори пояснюють утворення вільних радикалів, ініційоване кадмієм, так: кадмій витісняє іони заліза та міді з цитоплазматичних і мембранних білків, які, у свою чергу, ініціюють продукування вільних радикалів у реакціях Фентона [11, 15]. У ході наших досліджень виявлено збільшення продукції активних форм кисню. Як свідчать дані, наведені в таблиці 1, утворення всіх досліджуваних АФК підвищилося під впливом кадмію хлориду. Зокрема, загальна (нестимульована) продукція супероксид-аніон-радикала в печінці максимально зросла на 4-ту добу від моменту введення токсиканта і становила 186 % від рівня інтактних тварин. На 7-му та 10-ту доби експерименту швидкість утворення цього радикала знизилася і складала, відповідно, 122 та 103 % від рівня в контрольних щурів. При зміні умов функціонування дихального ланцюга в ньому також можливе одоелектронне відновлення

кисню. Це пояснюється тим, що його спорідненість до убіхінону стає більшою, ніж до цитохромоксидази. Ми досліджували продукцію $O_2^{\cdot-}$ в мітохондріальному та мікосомальному електронно-транспортних ланцюгах при її стимулюванні редукованими НАДФ і НАД. Генерування $O_2^{\cdot-}$ від цих систем було значно вищим в уражених тварин, ніж в інтактних, проте менш вираженим на 4-ту добу порівняно із загальною (нестимульованою) продукцією. Однак у мітохондріальному ланцюгу вона зростала вже з 1-ї доби і тривала до 4-ї.

Зокрема, стимульована за допомогою НАДФН продукція $O_2^{\cdot-}$ від мікосомального електронно-транспортного ланцюга становила на 1-шу добу 105 %, на 4-ту – 117 %, на 7-му – 110 % і на 10-ту – 102 % від рівня в інтактних тварин. Стимульоване за допомогою НАДН генерування $O_2^{\cdot-}$ від мітохондріального електронно-транспортного ланцюга зростало більшою мірою та становило на 1-шу і 4-ту доби, відповідно, 129 та 126 %, а на 7-му і 10-ту – 114 та 101 % від продукції аналогічного показника в щурів контрольної групи. Отже, найбільша роль в утворенні супероксид-аніон-радикала належить мітохондріям. Ці дані узгоджуються з результатами інших авторів [8].

Пероксид водню в прямому значенні не є вільним радикалом, але має здатність ініціювати вільнорадикальне окиснення, його вважають цитотоксичною сполукою. Зафіксовано значне зростання під впливом $CdCl_2$ концентрації H_2O_2 в плазмі крові, яка становила 159 та 156 %, порівняно зі щурами контрольної групи, на 1-шу і 4-ту доби від моменту введення токсиканта. У пізніші терміни експерименту концентрація H_2O_2 починала повільно знижуватися, проте до 10-ї доби складала 145 % від

Таблиця 1 – Продукція активних форм кисню в печінці та плазмі крові тварин, уражених кадмію хлоридом ($M \pm m$, $n=6$)

Показник	Досліджуваний матеріал	Група тварин				
		інтактні	уражені кадмію хлоридом			
			1-ша доба	4-та доба	7-ма доба	10-та доба
$O_2^{\cdot-}$ (загальна продукція), мкмоль/(с·кг)	Печінка	0,73±0,02	0,75±0,02	1,37±0,10 $p_1 < 0,05$	0,89±0,03 $p_1 < 0,05$	0,75±0,03
$O_2^{\cdot-}$ (продукція від мікосом), мкмоль/(с·кг)	Печінка	15,33±0,33	16,02±0,43	17,97±0,53 $p_1 < 0,05$	16,94±0,53	15,66±0,90
$O_2^{\cdot-}$ (продукція від мітохондрій), мкмоль/(с·кг)	Печінка	16,77±0,46	21,55±0,44 $p_1 < 0,05$	21,16±0,90 $p_1 < 0,05$	19,11±0,44 $p_1 < 0,05$	17,00±0,86
H_2O_2 , г/кг білка	Плазма крові	0,40±0,01	0,63±0,02 $p_1 < 0,05$	0,62±0,03 $p_1 < 0,05$	0,59±0,01 $p_1 < 0,05$	0,58±0,02 $p_1 < 0,05$
OH^{\cdot} ум. од.	Печінка	4,53±0,11	5,75±0,23 $p_1 < 0,05$	6,60±0,17 $p_1 < 0,05$	5,39±0,27 $p_1 < 0,05$	4,89±0,20

Примітка. Тут і в наступній таблиці: p_1 – відмінності вірогідні порівняно з інтактними тваринами.

рівня в інтактних тварин, тобто залишалася вірогідно високою. За звичайних умов H_2O_2 розкладається під дією ферментів каталази й глутатіонпероксидази, тому його концентрація в біологічних рідинах не є високою. Різде зростання вмісту цього метаболіту, можливо, зумовлене взаємодією іонів важких металів із SH-групами ферментів-антиоксидантів і, як наслідок, зниженням їх активності [12]. Пероксид водню не є вільним радикалом, але має здатність ініціювати вільнорадикальне окиснення, тому його вважають цитотоксичною сполукою. Але найбільша шкода від H_2O_2 полягає в тому, що в реакції Хабер-Вейса він, взаємодіючи із супероксид-аніон-радикалом, утворює найнебезпечніший гідроксильний радикал [1]. При інтоксикації кадмієм продукція $OH\cdot$ найбільше зросла на 4-ту добу дослідження і становила 145 % від рівня продукції цього радикала в інтактних тварин. Але в наступні доби експерименту його вміст поступово знижувався і на 7-му добу був вищим від такого в інтактних тварин на 19 %, а на 10-ту – на 8 % й істотно не відрізнявся від контролю.

Ці дані свідчать про те, що кадмій як важкий метал значно змінював рівновагу продукції АФК, але утворення більшості радикалів наблизилося до норми на момент завершення експерименту.

За умов кадміїндукованого оксидативного стресу показники антиоксидантної системи зазнавали змін. Результати досліджень показали пригнічення як ферментативної (СОД), так і неферментативної (сечова кислота) ланок цієї захисної системи (табл. 2).

Одним із головних механізмів захисту є функціонування антиоксидантних ферментів, які розкладають H_2O_2 , зокрема СОД. Активність цього ензиму зазнавала майже однакового пригнічення на 1-шу і 4-ту доби експерименту, що становило приблизно 78 % від активності в інтактних тварин. З наступних 7-ї та 10-ї діб дослідження мало місце незначне підвищен-

ня активності СОД, але рівня неуражених щурів вона не досягала і складала 81 та 86 % відповідно ($p_1 < 0,02$). Отже, впродовж усього експерименту під впливом кадмію хлориду спостерігали зниження активності СОД. Дія важких металів на інгібування супероксиддисмутази, можливо, зумовлена зв'язуванням SH-груп ферменту і денатурацією його молекули. Автор E. Casalino у своїй роботі припускає, що кадмій, імовірно, зв'яже імідазольну групу гістидину-74 в молекулі супероксиддисмутази, що і блокує її діяльність [12]. Інтенсивніше зниження функціонування СОД спричиняє, очевидно, підвищена концентрація пероксиду водню, що, як відомо, є інгібітором реакції дисмутації супероксидних радикалів.

Крім ферментативної ланки антиоксидантної системи, в організмі присутній ряд низькомолекулярних сполук, що проявляють подібну дію. До них належить сечова кислота, яка є "пасткою" для вільних радикалів, оскільки може реагувати з ними, утворюючи малоактивні радикали уратів [14]. Цим сечова кислота інгібує утворення пероксидних радикалів і захищає ліпопротеїни сироватки крові від окиснення. Концентрація сечової кислоти при збільшенні продукції АФК різко знижувалася. Мінімального значення вміст сечової кислоти досягав на 4-ту добу від моменту інтоксикації важким металом і становив 54 % від її рівня в неуражених щурів, але відновлення концентрації цього антиоксиданту було більш позитивним, ніж активності СОД, і на 10-ту добу експерименту складало 97 %, що вірогідно не відрізнялося від рівня в інтактних тварин. Зменшення вмісту сечової кислоти, очевидно, може бути наслідком зниження активності ксантинооксидази в результаті впливу іонів кадмію, що як прооксиданти переводять молекулярний кисень в активні форми, позбавляючи, таким чином, ксантинооксидазу субстрату, необхідного для утворення цього продукту.

Таблиця 2 – Динаміка показників антиоксидантної системи в печінці та плазмі крові тварин з кадмієвою інтоксикацією ($M \pm m$, $n=6$)

Показник	Досліджуваний матеріал	Група тварин				
		інтактні	уражені кадмію хлоридом			
			1-ша доба	4-та доба	7-ма доба	10-та доба
СОД, 10^6 ум. од./кг	Печінка	$1,45 \pm 0,07$	$1,13 \pm 0,07$ $p_1 < 0,05$	$1,12 \pm 0,05$ $p_1 < 0,05$	$1,17 \pm 0,05$ $p_1 < 0,05$	$1,24 \pm 0,03$ $p_1 < 0,05$
Сечова кислота, мкмоль/л	Плазма крові	$345,56 \pm 14,71$	$287,11 \pm 15,28$	$187,49 \pm 16,85$ $p_1 < 0,05$	$262,48 \pm 11,31$ $p_1 < 0,05$	$334,55 \pm 10,53$

ВИСНОВКИ. 1. Іони кадмію діють в організмі як прооксиданти, підвищують інтенсивність

утворення активних форм кисню та викликають оксидативний стрес.

2. Вплив кадмію хлориду пригнічує функціонування антиоксидантної системи, зокрема

знижуються активність супероксиддисмутази та вміст сечової кислоти.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Владимиров Ю. А. Свободные радикалы в биологических системах [Электронный ресурс] / Ю. А. Владимиров // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – 6, № 12. – С. 13–19. — Режим доступа до журн. : http://window.edu.ru/window_catalog/files/r20568/0012_013.pdf
2. Губский Ю. И. Химические катастрофы и экология / Ю. И. Губский, В. Б. Долго-Сабуров, В. В. Храпак. – К. : Здоров'я, 1993. – 224 с.
3. Данилович Ю. В. Взаимосвязь образования NO та H₂O₂ и их роль в регуляции ионного гомеостаза клеток / Ю. В. Данилович // Укр. біохім. журн. – 2001. – 73, № 3. – С. 5–18.
4. Киреев Р. А. Влияние ионов кадмия на свободнорадикальные процессы и активность Na⁺, K⁺-АТФ-азы в тканях крыс / Р. А. Киреев // Токсикол. вестник. – 2005. – № 4. – С. 12–15.
5. Окислительный стресс и уровень антиоксидантных ферментов в органах *triticosecale* при действии кадмия / А. Р. Гарифзянов, И. А. Ермакова, Ю. О. Пантюхин, В. В. Иванищев // Fundamental research. – 2012. – № 4. – С. 190–195.
6. Почерняева В. Ф. Определение источников активных форм кислорода / В. Ф. Почерняева, О. И. Цебржинский, Н. В. Шиш // Буковин. мед. вісник. – 2005. – 9, № 2. – С. 214–215.
7. Чевари С. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологическом материале / С. Чевари, И. Чаба, Й. Секей // Лаб. дело. – 1985. – № 11. – С. 678–681.
8. Cadenas E. Mitochondrial Free Radical Generation Oxidative Stress and Aging / E. Cadenas, K. J. A. Davies // Free Radic. Biol. Med. – 2000. – 29, № 3–4. – P. 222–230.
9. Chung S.-K. Hydroxy radical scavengers from white mustard (*Sinapis alba*) / S.-K. Chung, T. Osawa // Food Science and Biotechnology. – 1998. – 7, № 4. – P. 209–213.
10. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. – Council of Europe. Strasbourg. – 1986. – № 123. – 52 p.
11. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis / M. Waisberg, P. Joseph, B. Hale, D. Beyersmann // Toxicology. – 2003. – № 192. – P. 95–117.
12. Molecular inhibitory mechanisms of antioxidant enzymes in rat liver and kidney by cadmium / E. Casalino, G. Calzaretto, C. Sblano, C. Landriscina // Toxicology. – 2002. – № 30. – P. 37–50.
13. Nedoluzhko A. I. Enzymatic oxidation of cadmium and lead metals photodeposited on cadmium sulphide / A. I. Nedoluzhko, I. A. Shumilin, L. E. Mazhrova // Bioelectrochemistry. – 2001. – 53, № 1. – P. 61–71.
14. Waring W. S. Uric acid: an important antioxidant in acute ischemic stroke / W. S. Waring // Q J Med. – 2002. – 95. – P. 691–693.
15. Watjen W. Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: influence of oxidative stress / W. Watjen, D. Beyersmann // Biometals. – 2004. – № 17. – P. 65–78.

М. В. Кирилив

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

ОКСИДАТИВНЫЙ СТРЕСС В БЕЛЫХ КРЫС ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ВЛИЯНИИ ИОНОВ КАДМИЯ

Резюме

Изучено влияние кадмия хлорида на генерацию активных форм кислорода. В этих условиях повышаются продукция супероксид-анион-радикала, скорость образования гидроксильного радикала и содержание пероксида водорода. Исследовано состояние ферментативного и неферментативного звеньев антиоксидантной системы. Обнаружено угнетение активности супероксиддисмутазы и снижение концентрации мочевой кислоты. Установлено, что токсическое воздействие ионов кадмия вызывает оксидативный стресс.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: оксидативный стресс, кадмия хлорид, свободные радикалы, антиоксидантная система.

OXIDATIVE STRESS IN WHITE RATS IN CASE OF CADMIUM IONS TOXIC INFLUENCE

Summary

The effect of cadmium chloride on the generation of reactive oxygen species was studied. In these conditions, production of superoxide anion radical, hydroxyl radical and contents of hydrogen peroxide is increased. The state of enzymatic and non-enzymatic parts of antioxidant system units was investigated. Superoxide dismutase revealed suppression of the activity and reduce the concentration of uric acid. It was found that the toxicity of cadmium ions causes oxidative stress.

KEY WORDS: oxidative stress, cadmium chloride, free radicals, antioxidant system.

Отримано 06.09.13

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