

## ТОКСИЧНИЙ ВПЛИВ КОБАЛЬТУ ХЛОРИДУ НА ШВИДКІСТЬ УТВОРЕННЯ АКТИВНИХ ФОРМ КИСНЮ ТА ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ В ОРГАНІЗМІ БІЛИХ ЩУРІВ

*У статті оцінено токсичний вплив кобальту хлориду на генерацію активних форм кисню та показники вільнорадикального окиснення ліпідів. Встановлено, що катіони кобальту викликають підвищене утворення супероксид-аніон радикала та пероксиду водню. Виявлено подальший вплив цих порушень на процеси ліпопероксидації, що підтверджується збільшенням вмісту дієнових кон'югатів та ТБК-активних продуктів.*

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** кобальту хлорид, активні форми кисню, вільнорадикальне окиснення ліпідів.

**ВСТУП.** Присутність в організмі металів змінної валентності спричиняє активацію процесів окиснення. Кобальт у мінімальних дозах є фізіологічно активним в організмі людини у формі кобаламіну (вітаміну  $B_{12}$ ). Проте при надлишковому надходженні його в організм погіршується стан здоров'я. Кобальт як метал змінної валентності може викликати зміщення рівноваги між активними формами кисню та системами антиоксидантного захисту в бік зростання рівня вільних радикалів (зокрема гідроксильного радикала) та зменшення вмісту антиоксидантів, що супроводжується активацією ланцюгових реакцій окиснення ліпідів, розвитком оксидативного стресу [14, 15]. Прооксидантна роль кобальту за цих умов пов'язана з його здатністю взаємодіяти з пероксидом водню з утворенням вільних радикалів, активувати ферментні системи утворення активних форм кисню, індукувати синтез протизапальних цитокінів [13].

У зв'язку з цим, метою роботи було вивчити токсичний вплив кобальту хлориду на генерацію супероксид-аніон радикала, вміст пероксиду водню і продуктів ліпопероксидації в плазмі крові та печінці білих щурів.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Експериментальні дослідження проведено на білих статевозрілих щурах-самцях масою 180–200 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Токсичне ураження викликали шляхом одноразового внутрішньошлункового введення їм водного розчину кобальту хлориду в дозі 5 мг/кг

маси тіла ( $1/12 LD_{50}$ ) [1]. Тварин було поділено на 2 групи: 1-ша група – інтактні тварини, 2-га – тварини, уражені кобальту хлоридом. Декапітацію щурів здійснювали під тіопенталовим наркозом через 1, 4, 7 та 10 діб від моменту введення отруту згідно з правилами Європейської конвенції про гуманне ставлення до лабораторних тварин [11]. Досліджували плазму крові й тканину печінки, з якої на холоді готували 10 % гомогенат на фосфатному буфері (рН=7,4).

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 в цьому процесі [4]. Вміст пероксиду водню ( $H_2O_2$ ) визначали спектрофотометричним методом за знебарвленням перманганату калію при внесенні кислоторозчинної фракції, що містить  $H_2O_2$  [2]. Рівень вільнорадикального окиснення ліпідів оцінювали за вмістом ТБК-активних продуктів (ТБК АП) [7] та концентрацією дієнових кон'югатів (ДК), які екстрагували в гептан-ізопропаноловій суміші й реєстрували при  $\lambda=232$  нм [6]. Цифровий матеріал піддавали статистичному аналізу з використанням t-критерію Стьюдента [3]. Зміни вважали вірогідними при  $p<0,05$ ,  $p<0,02$ ,  $p<0,01$ ,  $p<0,001$ . Для розрахунків застосовували комп'ютерну програму Excel (Microsoft).

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Як свідчать результати наших досліджень (табл. 1), введення щурам токсичної дози кобальту хлориду спричинило підвищення продукції активних

© М.В. Чорна, І.Я. Криницька, І.Р. Бекус, 2011.

форм кисню. Зокрема, загальна продукція супероксид-аніон радикала зростала в 1,1 та 1,2 раза на 1-шу і 4-ту доби відповідно після введення токсиканту порівняно з контрольними тваринами. До 10-ї доби після ураження рівень утворення цього радикала становив 108 % і вірогідно не відрізнявся від такого в інтактних тварин. Щодо швидкості утворення  $O_2^{\cdot-}$  в мікосомальному електронно-транспортному ланцюгу при стимулюванні за допомогою НАДФН, то вона також зростала, як і нестимульована продукція, та найбільше відрізнялася на 4-ту і 7-му доби, що було, відповідно, на 18 та 11 % більше від такої в інтактних тварин. Подібних змін зазнавала і швидкість утворення супероксиду в мітохондріальному електронно-транспортному ланцюгу з індуктором НАДН, але її інтенсивність була значно вищою і становила 122, 170, 118 та 105 % на 1-шу, 4-ту, 7-му і 10-ту доби відповідно порівняно з інтактними тваринами.

Пероксид водню, хоча 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 [8, 12]. Як видно з таблиці 1, концентрація пероксиду водню в плазмі крові щурів з кобальтовою інтоксикацією підвищувалась уже через 24 год після введення отрути і була в 1,8 раза більшою, ніж в інтактних тварин. На 4-ту добу вміст  $H_2O_2$  залишався майже таким самим і становив 175 % від рівня контролю. На наступному етапі досліджень спостерігалось зниження вмісту  $H_2O_2$ , але його рівень залишався вірогідно високим до завершення дослідження і на 10-ту добу був в 1,5 раза більшим від контролю ( $p_1 < 0,001$ ).

Таким чином, найбільша інтенсивність утворення АФК спостерігалась на 4-й день після введення кобальту хлориду. Можна вважати, що в основі таких змін за дії іонів кобальту лежать надмірне виснаження системи антиоксидантного захисту і неспроможність захисних адаптивних механізмів до підвищення антиоксидантних властивостей тканин [9]. Але в наступні терміни внаслідок стимуляції захисних систем інтенсивність утворення вільних радикалів дещо зменшувалась, можливо, тому, що введення іонів металів було одноразовим, їх кумуляція не відбувалася і організм мобілізував захисні сили.

Таблиця 1 – Продукція активних форм кисню у тварин, уражених кобальту хлоридом ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )

Показник	Досліджуваний матеріал	Група тварин				
		інтактні	уражені кобальту хлоридом			
			1 доба	4 доба	7 доба	10 доба
$O_2^{\cdot-}$ (загальна продукція), мкмоль/(с·кг)	Печінка	0,73±0,01	0,81±0,04	0,90±0,04 $p_1 < 0,01$	0,86±0,03 $p_1 < 0,02$	0,79±0,03
$O_2^{\cdot-}$ (продукція від мікосом), мкмоль/(с·кг)	Печінка	15,33±0,33	15,94±0,87	18,07±0,21 $p_1 < 0,001$	16,94±0,52 $p_1 < 0,05$	15,55±0,43
$O_2^{\cdot-}$ (продукція від мітохондрій), мкмоль/(с·кг)	Печінка	16,77±0,46	20,39±0,87 $p_1 < 0,02$	28,55±0,47 $p_1 < 0,001$	19,83±0,47 $p_1 < 0,01$	17,55±0,45
$H_2O_2$ , г/кг білка	Плазма крові	0,397±0,014	0,701±0,038 $p_1 < 0,001$	0,695±0,043 $p_1 < 0,001$	0,605±0,018 $p_1 < 0,001$	0,595±0,022 $p_1 < 0,001$

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

Збільшення утворення активних форм кисню, безперечно, впливає на окиснення ліпідів. Як видно з таблиці 2, показники ліпопероксидації зазнавали зростання при отруєнні тварин кобальту хлоридом. Вміст ДК збільшувався вже на 1-шу добу і становив у плазмі крові 134 % ( $p_1 < 0,01$ ), а на 4-ту – 127 % ( $p_1 < 0,02$ ) від рівня інтактних тварин. Починаючи із 7-ї доби від моменту введення токсиканту, можна було

спостерігати зменшення концентрації цього показника, однак не до рівня інтактних тварин. Концентрація ДК у печінці на 1-шу добу від моменту ураження становила 232 % від рівня інтактних щурів, а на 4-ту – 169 %. Через 7 та 10 діб вміст ДК знижувався, але дані були статистично вірогідно вищими від рівня контрольних тварин і становили на 7-му добу 135 %, на 10-ту – 123 %. Збільшення концен-

трації ДК, що є первинними продуктами ПОЛ і токсичними метаболітами, призводить до деградації ліпопротеїнів, ферментів та нуклеїнових кислот [10].

Що стосується ТБК АП, то їх концентрація також збільшувалася при введенні щурам кобальту хлориду. В плазмі крові й печінці максимальні зміни зафіксовано на 4-ту добу – на рівні, відповідно, 148 та 208 % проти інтактних тварин. Через 7 діб від моменту введення  $\text{CoCl}_2$

концентрація ТБК-активних продуктів у плазмі крові суттєво знизилась, а в печінці залишалась майже на попередньому рівні (199 % від інтактних). До закінчення експерименту вміст ТБК АП залишався вірогідно вищим, порівняно з інтактними тваринами, лише в печінці отруєних щурів, тоді як на 10-ту добу після введення токсиканту концентрація прикінцевих продуктів ПОЛ вірогідно не відрізнялася від такої в плазмі крові неуразених тварин.

Таблиця 2 – Динаміка показників вільнорадикального окиснення ліпідів у тварин з кобальтовою інтоксикацією ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )

Показник	Досліджуваний матеріал	Група тварин				
		інтактні	уражені кобальту хлоридом			
			1 доба	4 доба	7 доба	10 доба
ДК, ум. од./л	Плазма крові	1,19±0,06	1,59±0,06 $p_1 < 0,01$	1,51±0,06 $p_1 < 0,02$	1,43±0,06 $p_1 < 0,05$	1,33±0,05
ДК, ум. од./кг	Печінка	7,16±0,26	16,63±0,51 $p_1 < 0,001$	12,10±0,55 $p_1 < 0,001$	9,63±0,49 $p_1 < 0,01$	8,83±0,41 $p_1 < 0,02$
ТБК АП, мкмоль/л	Плазма крові	2,13±0,05	2,93±0,17 $p_1 < 0,01$	3,16±0,29 $p_1 < 0,02$	2,47±0,11 $p_1 < 0,05$	2,23±0,08
ТБК АП, мкмоль/кг	Печінка	3,50±0,14	6,50±0,27 $p_1 < 0,001$	7,31±0,23 $p_1 < 0,001$	6,97±0,43 $p_1 < 0,001$	4,70±0,30 $p_1 < 0,02$

На основі вищенаведеного можна констатувати, що отруєння кобальту хлоридом призводить до активації процесів пероксидного окиснення ліпідів у крові та печінці піддослідних тварин. Це пов'язано зі здатністю кобальту інактивувати сульфгідрильні групи антиоксидантних ферментів і, таким чином, посилювати утворення вільних радикалів, метаболіти яких, у свою чергу, активують ПОЛ [8]. А кобальт як метал змінної валентності може безпосередньо взаємодіяти з вільними радика-

лами, продовжуючи ланцюгові реакції ліпопероксидації.

**ВИСНОВКИ.** Зростання швидкості утворення АФК свідчить про значний прооксидантний вплив кобальту хлориду. Значна роль у продукції АФК належить мітохондріальному електронно-транспортному ланцюгу. Підвищена генерація вільних радикалів призводить до вірогідного збільшення процесів ліпопероксидації.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Губский Ю. И. Химические катастрофы и экология / Ю. И. Губский, В. Б. Долго-Сабуров, В. В. Храпак. – К. : Здоров'я, 1993. – 224 с.
2. Данилович Ю. В. Вплив стероїдних гормонів і окситоцину на утворення NO та  $\text{H}_2\text{O}_2$  в ендометрії / Ю. В. Данилович // Укр. біохім. журн. – 2004. – 76, № 1. – С. 88–96.
3. Ланкин Г. Ф. Биметрия / Г. Ф. Лакин. – М. : Высш. школа, 1990. – 352 с.
4. Почерняева В. Ф. Определение источников активных форм кислорода / В. Ф. Почерняева, О. И. Цебржинский, Н. В. Шиш // Буковинський медичний вісник. – 2005. – 9, № 2. – С. 214–215.
5. Самохіна Л. М. Вплив пентоксифіліну на показники перекисного окиснення ліпідів та вміст нітриту за умов інтоксикації хлоридом кобальту / Л. М. Самохіна, Т. М. Бондар, С. В. Оксененко // Сучасні проблеми токсикології. – 2003. – № 4. – С. 41–48.
6. Сопоставление различных подходов к определению перекисного окисления липидов в гептан-изопропанольных экстрактах крови / И. А. Волчегорский, А. Г. Налимов, Б. Г. Яровинский, Р. И. Лившиц // Вопросы мед. химии. – 1989. – № 1. – С. 127.
7. Стальная И. Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / И. Д. Стальная, Т. Г. Гаришвили ; под ред.

В. Н. Ореховича // Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. – С. 66–68.

8. Чорна М. В. Вплив хлориду кобальту на генерацію гідроксильного радикалу та стан антиоксидантної системи у тварин / М. В. Чорна, І. Р. Бекус, Н. А. Васишин // Здобутки клінічної і експериментальної медицини : підсумкова науково-практична конф., 13 черв. 2008 р. : тези доп. – Тернопіль, 2008. – С. 132.

9. Brown D. R. Neurodegeneration and oxidative stress: prior disease results from loss of antioxidant defence / D. R. Brown // Folia Neuropathol. – 2005. – **43**. – P. 229–243.

10. Cellular lipid peroxidation end-products induce apoptosis in human lens epithelial cells / S. Choudhary, W. Zhang, F. Zhou [et al.] // Free Radic. Biol. Med. – 2002. – **32**. – P. 360–369.

11. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other

scientific purposes. – Council of Europe. Strasbourg. – 1986. – № 123. – 52 p.

12. Hancock J. T. Role of reactive oxygen species in cell signaling pathways / J. T. Hancock, R. Desikan, S. J. Neill // Biochemical Society Transactions. – 2001. – **29**, part 2. – P. 345–350.

13. Inhalation toxicity and carcinogenicity studies of cobalt sulfate / J. R. Bucher, J. R. Hailey, J. R. Roycroft [et al.] // Toxicol. Sci. – 1999. – **49**. – P. 56–67.

14. Oxidative DNA base damage in renal, hepatic, and pulmonary chromatin of rats after intraperitoneal injection of cobalt(II) acetate / K. S. Kasprzak, T. H. Zastawny, S. L. North [et al.] // Chem. Res. Toxicol. – 1994. – **7**. – P. 35–329.

15. Physicochemical mechanism of the interaction between cobalt metal and carbide particles to generate toxic activated oxygen species / D. Lison, P. Carbonnelle, L. Mollo [et al.] // Chem. Res. Toxicol. – 1995. – **8**. – P. 6–60.

**М.В. Чорна, І.Я. Криницька, І.Р. Бекус**

*ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИМЕНИ И.Я. ГОРБАЧЕВСКОГО*

## **ТОКСИЧЕСКОЕ ВЛИЯНИЕ КОБАЛЬТА ХЛОРИДА НА СКОРОСТЬ ОБРАЗОВАНИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА И ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ В ОРГАНИЗМЕ БЕЛЫХ КРЫС**

### **Резюме**

*В статье оценено токсическое воздействие кобальта хлорида на генерацию активных форм кислорода и показатели свободнорадикального окисления липидов. Установлено, что катионы кобальта вызывают повышенное образование супероксид-анион радикала и пероксида водорода. Выявлено дальнейшее влияние этих нарушений на процессы липопероксидации, что подтверждается увеличением содержания диеновых конъюгатов и ТБК-активных продуктов.*

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** кобальта хлорид, активные формы кислорода, свободнорадикальное окисление липидов.

**M.V. Chorna, I.Ya. Krynytska, I.R. Bekus**

*I.YA. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY*

## **TOXIC EFFECT OF COBALT CHLORIDE ON THE RATE OF OXYGEN ACTIVE FORMS FORMATION AND LIPID PEROXIDATION IN WHITE RATS**

### **Summary**

*The article assesses toxic effect of cobalt chloride on the generation of reactive oxygen forms and indices of lipids free radical oxidation. It was determined, that cobalt cations cause increased formation of superoxide anion and hydrogen peroxide. There are further effects of these violations, the processes of lipid peroxidation, as evidenced by increased content of diene conjugates and TBA-active products.*

**KEY WORDS:** cobalt chloride, active forms of oxygen, free radical oxidation of lipids.

*Отримано 09.12.10*

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