

ВПЛИВ СВИНЦЮ НА АКТИВНІСТЬ ФЕРМЕНТІВ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ ТА ПРОЦЕСИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ В ЕРИТРОЦИТАХ КРОВІ КОРОПА ЛУСКАТОГО

М. Я. Онисковець, В.В. Снітинський
Onyskovets_M@mail.ru

Львівський національний аграрний університет НААН,
80381, Україна, м. Дубляни, вул. В. Великого, 1

*Відомо, що основним механізмом інтоксикації свинцем є розвиток оксидативного стресу, на що вказує порушення в про- та антиоксидантній системі крові, як інтегрального показника стану організму. У зв'язку з цим, актуальним є з'ясування метаболічних ефектів свинцю в еритроцитах крові, які одними з перших підпадають під вплив зміненого під дією токсикантів внутрішнього середовища організму, а також володіють потужною системою антиоксидантного захисту. Власне тому метою нашої роботи було дослідити вплив свинцю на активність ферментів антиоксидантного захисту та концентрацію продуктів перекисного окиснення ліпідів у еритроцитах коропа лускатого. У дослідженнях використовували дворічні особини коропа лускатого (*Cyprinus carpio L.*) середньою масою 300–350 г. У кожену експериментальну групу було включено по 7 особин. Досліджували вплив іонів свинцю (Pb^{2+}) у концентрації 0,2; 0,5 і 5 мг/л, що відповідають 2, 5 і 50 гранично допустимим концентраціям (ГДК) на організм риби. Риб витримували в середовищі з додаванням ацетату свинцю впродовж 96 год. В результаті проведених досліджень було виявлено вірогідне зростання активності ферментів антиоксидантного захисту при експозиції з 2 та 5 ГДК йонів свинцю, та пригнічення активності ферментів при 50 ГДК, що вказує на значне напруження захисних систем організму на тлі активації оксидативного стресу. Встановлені ефекти супроводжуються акумуляцією продуктів перекисного окиснення ліпідів (малоновий діальдегід, дієнові кон'югати) у еритроцитах піддослідних риб, що носить характер, який залежить від дії токсиканта в певній дозі. Отримані дані показали, що еритроцити риб є особливо чутливими до дії оксидативного стресу, викликаного йонами свинцю, тому актуальною є розробка засобів, які б попереджували нагромадження в цих клітинах продуктів вільнорадикальних реакцій.*

Ключові слова: СВИНЕЦЬ, ЕРИТРОЦИТИ, КРОВ, АНТИОКСИДАНТНА СИСТЕМА, ПРОДУКТИ ПОЛ, ОКСИДАТИВНИЙ СТРЕС, КОРОП ЛУСКАТИЙ

THE EFFECT OF LEAD ON THE ACTIVITY OF ENZYMES OF ANTIOXIDANT PROTECTION AND LIPID PEROXIDATION IN ERYTHROCYTES OF CARP FLAKE

М. Ya. Onyskovets, V. V. Snitinskiy
Onyskovets_M@mail.ru

Lviv National Agrarian University NAAS; 1 V. Velykyj Str, Dubliany, 80381, Ukraine

*It is known that the main mechanism of lead toxicity is the development of oxidative stress as evidenced by disturbances in the pro-and antioxidant blood system as an integral indicator of the body status. In this regard, important is to ascertain the metabolic effects of lead in red blood cells that are among the first to fall under the influence of toxins altered internal environment and possess strong antioxidant defense system. The purpose of our study was to investigate the effect of lead on the activity of antioxidant enzymes and concentration of lipid peroxidation products in erythrocytes of carp flake. In our studies we used a two-year carp flake (*Cyprinus carpio L.*) with average weight 300–350 g. Each experimental group included in 7 animals. We investigated the influence of lead ions (Pb^{2+}) at a concentration of 0.2, 0.5 and 5*

mg/l, corresponding to 2; 5 and 50 maximum permissible concentration (MPC) on the fish organism. Fish was kept in a medium with the addition of lead acetate for 96 h. As a result of the studies we found a significant increase in the activity of antioxidant enzymes during exposure of 2 and 5 MPC lead ions, and inhibition of enzyme activity at 50 MPC, indicating significant stress protective systems against the background of activation of oxidative stress. Installed effects are accompanied by accumulation of lipid peroxidation products (malonic dialdehyde, diene conjugates) in erythrocytes of experimental fish in dose-dependent manner. The data showed that the red blood cells of fish are particularly sensitive to oxidative stress induced by lead ions, so urgent is to develop tools that would have warned accumulation of the free radical reactions products in these cells.

Keywords: LEAD, ERYTHROCYTES, BLOOD, ANTIOXIDANT SYSTEM, LIPID PEROXIDATION PRODUCTS, OXIDATIVE STRESS, CARP FLAKE

ВЛИЯНИЕ СВИНЦА НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ И ПРОЦЕССЫ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В ЭРИТРОЦИТАХ КРОВИ КАРПА ЧЕШУЙЧАТОГО

М. Я. Онисковец, В. В. Снитинский
Onyskovets_M@mail.ru

Львовский национальный аграрный университет НААН,
Украина, 80381, г. Дубляны, ул. В. Великого, 1

*Известно, что основным механизмом интоксикации свинцом является развитие оксидативного стресса, о чем свидетельствуют нарушения в про- и антиоксидантной системе крови как интегрального показателя состояния организма. В связи с этим, актуальным является выяснение метаболических эффектов свинца в эритроцитах крови, которые одними из первых попадают под влияние измененного под действием токсикантов внутренней среды организма, а также обладают мощной системой антиоксидантной защиты. Поэтому, целью нашей работы было исследовать влияние свинца на активность ферментов антиоксидантной защиты и концентрацию продуктов перекисного окисления липидов в эритроцитах карпа чешуйчатого. В исследованиях использовали двухлетние особи карпа чешуйчатого (*Cyprinus carpio* L.) средней массой 300–350 г. В каждую экспериментальную группу были включены по 7 особей. Исследовали влияние ионов свинца (Pb^{2+}) в концентрациях 0,2; 0,5 и 5 мг / л, соответствующие 2; 5 и 50 предельно допустимым концентрациям (ПДК) на организм рыбы. Рыб выдерживали в среде с добавлением ацетата свинца в течение 96 час. В результате проведенных исследований было выявлено достоверное увеличение активности ферментов антиоксидантной защиты при экспозиции с 2 и 5 ПДК ионов свинца, и угнетение активности ферментов при 50 ПДК, что свидетельствует о значительном напряжении защитных систем организма на фоне активации оксидативного стресса. Установленные эффекты сопровождаются аккумуляцией продуктов перекисного окисления липидов (малонового диальдегид, диеновые конъюгаты) в эритроцитах подопытных рыб, носят дозозависимый характер. Полученные данные показали, что эритроциты рыб особенно чувствительны к оксидативному стрессу, вызванному ионами свинца, поэтому актуальной является разработка средств, которые предупреждают накопление в этих клетках продуктов свободнорадикальных реакций.*

Ключевые слова: СВИНЕЦ, ЭРИТРОЦИТЫ, КРОВЬ, АНТИОКСИДАНТНАЯ СИСТЕМА, ПРОДУКТЫ ПОЛ, ОКСИДАТИВНЫЙ СТРЕСС, КАРП ЧЕШУЙЧАТЫЙ

В останні роки особливого акценту набувають роботи, пов'язані з посиленням надходженням і накопиченням у водних екосистемах важких металів, які відносять до групи найбільш загрозливих видів антропогенного забруднення [1]. Свинець включений до металів, граничнодопустимі концентрації яких значно перевищують реальні природні фонові

значення. Дослідження токсичної забрудненості іхтіофауни поверхневих вод України, показали, що за вмістом іонів свинцю у рибі, понад 15 % водойм перевищують допустимі норми, за цих умов близько 5 % — більш ніж удвічі [1, 2].

Як відомо, одним з головних механізмів інтоксикації свинцем є розвиток оксидативного стресу, на що вказує порушення в про- та антиоксидантній системі крові як інтегрального показника стану організму [3, 4]. В зв'язку з цим, становить зацікавлення з'ясування метаболічних ефектів свинцю в еритроцитах — клітинах, які, з одного боку, одними з перших підпадають під вплив зміненого під дією токсикантів внутрішнього середовища організму, а з другого — володіють потужною системою антиоксидантного захисту [5]. Тому метою нашої роботи було дослідити вплив свинцю на активність ферментів антиоксидантного захисту та концентрацію продуктів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) в гемолізаті еритроцитів коропа лускатого.

Матеріали і методи

Досліди проводили на коропах (*Cyprinus carpio L.*) дворічного віку вагою 300–350 г. Досліди проводили в резервуарах об'ємом 200 л. У ході експериментів рибу не годували. В кожну експериментальну групу було включено по 7 особин. Досліджували вплив на риб іонів свинцю Pb^{2+} — при 0,2; 0,5 та 5 мг/л, що відповідають 2, 5 та 50 гранично допустимим концентраціям (ГДК). Риб витримували в середовищі 96 годин. Контрольну групу риб витримували аналогічний термін у звичайних умовах, без додавання ацетату свинцю. Здійснювали постійну аерацію і підтримували температурний режим води на рівні — 18–20 °С. Кров забирали за допомогою пастерівської піпетки з серця риб. Гемолізат еритроцитів отримували згідно Nishikimi N. et al. (1972).

Визначали активність антиоксидантних ферментів в гемолізаті еритроцитів: супероксиддисмутази (СОД) (Дубинина Е. Е. с соавт., 1983), каталази (Королук М. А. и соавт., 1988), глутатіонпероксидази (ГП) (Paglia D.E., Valentine W. N., 1967), глутатіонредуктази (ГР) (Kaplan J. C., 1969). Для визначення малонового діальдегіду (МДА) використовували методику Yagi Y. et al. (1976), а вміст дієнових коню'гатів (ДК) досліджували згідно з Гавриловим В. Б., Мишкорудной М. И. (1983). Кількість білка визначали за Lowry et al. (1951).

Статистичне опрацювання результатів проводили за допомогою програми Statistk із використанням t-тесту Стьюдента. Рівень вірогідності отриманих результатів встановлювали при $p < 0,05$ – $0,001$.

Результати й обговорення

З літературних джерел відомо, що відповідь організму на дію токсиканту є результатом взаємодії двох процесів: пошкодження (деструктивний) та захисту (компенсаторно-адаптивний) [6]. Їх співвідношення визначає рівень токсичності водного середовища для риб [7, 8]. В організмі тварин важливе значення має функціональна активність внутрішньоклітинних захисних систем, до яких, у першу чергу, належить система антиоксидантного захисту — комплекс неферментних антиоксидантів і спеціалізованих ферментів-антиоксидантів [4, 8].

Першим кроком в рамках виконання нашого дослідження було визначення активності одного з головних ферментів першої ланки ферментативного антиоксидантного захисту — супероксиддисмутази. Для дослідження активності даного ензиму, який є одним з головних факторів захисту від супероксиданіону [9], використовували найефективніший на сьогодні метод — реакцію відновлення нітросинього тетразолію. Згідно з отриманими результатами було встановлено, що за дії йонів свинцю в концентрації 2 та 5 ГДК відзначалося вірогідне

зростання активності супероксиддисмутази в гемолізаті еритроцитів, в той же час при застосуванні концентрації 50 ГДК детектувалося значне зниження ферментативної активності даного ензиму (рис.) Такий факт можна пояснити виникненням оксидативного стресу, коли свинець є тригером кисень-опосередкованого ушкодження клітинних макромолекул, зокрема, ліпідів та білків.

Щодо каталази, то цей фермент розкладає перекис водню, який утворюваний у процесі окиснення, на воду та молекулярний кисень, а також окиснює при наявності перекису водню низькомолекулярні спирти і нітрити та бере участь у процесах клітинного дихання. Дослідження показали зростання активності каталази у гемолізаті еритроцитів піддослідних тварин. Так, при дії йонів свинцю у концентрації 2 та 5 ГДК в гемолізаті еритроцитів відзначалося вірогідне зростання активності каталази на 21 та 23%, відповідно. В той же час, після інкубації піддослідних особин з іонами свинцю в концентрації 50 ГДК спостерігалось вірогідне зниження активності каталази, практично, в два рази. Даний факт вказує на зростання вмісту пероксиду водню на тлі відсутності впливу на активний центр ензиму йонів свинцю. Така дія йонів свинцю може пояснюватися тим, що їх головною мішенню є тілові частини активних центрів ензимів, тоді як каталаза містить в активному центрі гем [9].

Крім супероксиддисмутази та каталази, одним з ключових та найефективніших антиоксидантних механізмів є система глутатіону. До неї відносяться глутатіонпероксидаза та глутатіонредуктаза — ферменти, які забезпечують з однієї сторони виконання глутатіоном дезінтоксикаційної функції у відношенні до перекису водню, а з іншої — рециклізацію глутатіону. Так, глутатіонпероксидаза каталізує реакцію перетворення перекису водню до води з утворенням окисненого глутатіону, а глутатіонредуктаза — його відновлення за участю NADPH. У гемолізаті еритроцитів при застосуванні йонів свинцю у концентрації 2 та 5 ГДК відзначалося вірогідне зростання активності глутатіонпероксидази на 21 та 30 %, відповідно. В той же час використання 50 ГДК йонів свинцю викликає зниження активності досліджуваного ферменту в 1,8 рази.

При використанні 2 та 5 ГДК йонів свинцю в гемолізаті еритроцитів відзначалося вірогідне зростання активності глутатіонредуктази на 22 та 35 %, відповідно. В той же час 50 ГДК призводили до значного зниження активності досліджуваного ферменту, практично, вдвічі (рис.). У результаті проведених досліджень було виявлено вірогідне зростання активності обох ферментів при експозиції з дією йонів свинцю з усіма досліджуваними дозами, що казує на значне напруження системи глутатіону на тлі активації оксидативного стресу. Ця активація, вірогідніше за все, має компенсаторний характер і виникає у відповідь на токсичну дію йонів свинцю, які опосередковано можуть викликати гіперпродукцію перекису водню в клітинах.

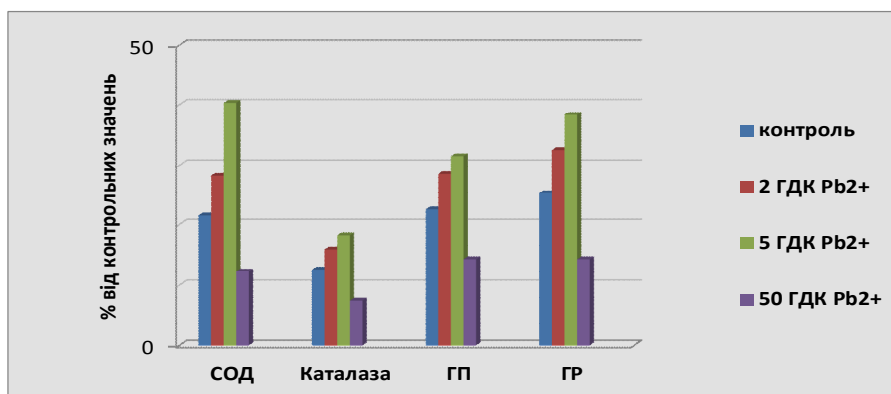


Рис. Вплив свинцю на активність ферментів антиоксидантної системи в гемолізаті еритроцитів коропа лускатого

На тлі підвищення активності антиоксидантних ферментів відбувається зростання кількості продуктів окиснювального ушкодження біомолекул, зокрема, ліпідів. Активація перекисного окиснення ліпідів розглядається як універсальна відповідь живої системи на дію екстремальних факторів середовища [7]. Оцінити ступінь та інтенсивність перекисних процесів можна двома шляхами: безпосереднім визначенням вільнорадикальних інтермедіатів ПОЛ або шляхом дослідження вмісту у біологічних тканинах перекисних продуктів [10]. Серед продуктів ПОЛ слід виділити дієнові кон'югати, які утворюються переважно на першому етапі перекисного окиснення ліпідів, та малоновий диальдегід, що утворюється в організмі при деградації поліненасичених ліпідів активними формами кисню та служить маркером ПОЛ і оксидативного стресу [11].

Згідно з отриманими результатами, вміст малонового диальдегіду за дії 2 ГДК вірогідно не змінювався, відзначалася лише тенденція до зростання даного показника. При 5 ГДК відзначалося вірогідне ($p < 0,05$) зростання досліджуваної сполуки більш ніж на 30 %. Найвища концентрація йонів свинцю викликала більш ніж двократне підвищення концентрації малонового диальдегіду (табл.). Наведені результати цілком узгоджуються з даними про активацію ферментів антиоксидантного захисту, які відповідають, власне, за знешкодження тригерів перекисного окиснення ліпідів.

Іншою групою маркерних сполук перекисного окиснення ліпідів є дієнові кон'югати, що представляють собою первинні продукти перекисного окиснення ліпідів. При вільнорадикальному окисненні арахідонової кислоти відбувається відрив водню в сигма-положенні у відношенні до подвійного зв'язку, що призводить до її переміщення з утворенням дієнових кон'югатів [12], які відносяться до токсичних метаболітів, що мають негативну дію на ліпопротеїни, білки, ферменти та нуклеїнові кислоти [13].

Наші дослідження показали, що 2 та 5 ГДК не викликали вірогідних змін у концентрації дієнових кон'югатів, тоді як 50 ГДК призводили до вірогідного зростання вмісту досліджуваних сполук в еритроцитах крові коропа майже в два рази, порівняно з контрольною групою (табл.).

Таблиця

Вміст продуктів ПОЛ в еритроцитах коропа за дії різних концентрацій йонів свинцю ($M \pm m$, $n=7$)

Продукти ПОЛ	Контроль	Концентрація свинцю, ГДК		
		2	5	50
ДК, мкмоль/мг білка	0,86±0,06	0,96±0,13	1,02±0,15	1,60±0,08**
МДА, нмоль/мг білка	30,58±3,52	35,24±2,85	41,58±3,74*	68,21±4,14***

Примітка: Вірогідність відмінностей у порівнянні з відповідними показниками у контрольній групі:

* — $p < 0,05$; ** — $p < 0,025$; *** — $p < 0,01$

Висновки

1. Встановлено вірогідне зростання активності ферментів антиоксидантного захисту в еритроцитах крові коропа лускатого при дії 2 та 5 ГДК йонів свинцю, та пригнічення активності даних ферментів при 50 ГДК, на що може вказувати значне напруження захисних систем організму на тлі активації оксидативного стресу.

2. Науково доведено, що за умов збільшення концентрації йонів токсиканта відбувається значне зростання кількості продуктів перекисного окиснення ліпідів (малоновий диальдегід, дієнові кон'югати) у гемолізаті еритроцитів піддослідних риб.

Перспективи подальших досліджень. З результатів досліджень видно, що еритроцити риб є особливо чутливими до дії оксидативного стресу, викликаного йонами

свинцю. У зв'язку з цим, актуальною є розробка засобів, які б попереджували нагромадження в цих клітинах продуктів вільнорадикальних реакцій, що є необхідною умовою здійснення еритроцитами їхньої основної функції — транспорту кисню.

1. Pilipenko Ju. V., Bedunkova O. O., Pilipenko E. Ju. Migracijni shljahi rozpovsjudzhennja ioniv vazhkih metaliv v organah i tkaninah rib-biomelioratoriv v umovah malih vodoshovishh [Pathways of heavy metals migration in organs and tissues of biomelioration fish in small reservoirs]. *Visnik Nacional'nogo universiteta vodnogo hozjajstva i prirodopolzovanija — Journal of The National University of Water Management and Nature*, 2007, vol. 2 (38), p. 313–318. (in Ukrainian).

2. Perevoznikov M. A., Bogdanova E. A. *Tjzhelye metally v presnovodnyh jekosistemah* [Heavy metals in freshwater ecosystems]. St. Petersburg, GosNIORKh, 1999, 28 p. (In Russian).

3. Adonaylo V. N., Oteiza P. I. Lead intoxication: antioxidant defenses and oxidative damage in rat brain. *Toxicol.*, 1999, vol. 135, no 2–3, pp. 77–85.

4. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.*, 2002, vol. 82, no 1, pp. 47–95.

5. Antonjak G. L., Panas N. C., Pershin O. I., Bershadskij V. I. Vpliv spoluk vazhkih metaliv na procesi perekisnogo okisnennja lipidiv ta funkcional'nu aktivnist' fermentiv-antioksidantiv v eritrocitah tvarin [Effect of heavy metals on lipid peroxidation and functional activity of antioxidant enzymes in animal red blood cells] *Zb. nauk. prac «Teorija ta praktika suchasnogo prirodnavstva»* [Proc. Science. works «Theory and practice of modern science»]. Herson, 2005, pp. 7–11 (in Ukrainian).

6. Filenko O. F. *Nekotorye universalnye zakonomernosti dejstvija himicheskikh agentov na vodnye organizmy. Avtoref. dys. doctora biol. nauk* [Some universal regularities of the chemicals agents effect on water organisms. Dr. biol. sci. diss.]. Moscow, 1990. 36 p. (In Russian).

7. Leus Ju. V. *Perekisne okisnennja lipidiv ta antioksidantnij zahist u rib pid vplivom faktoriv vodnogo seredovishha. Avtoref. dys. kand. biol. nauk* [Lipid peroxidation and antioxidant protection in fish exposed aquatic environment factors. Cand. biol. sci. diss.]. Kiev, 1998. 16 p. (in Ukrainian).

8. Beckman K., Ames B. N. The free radical theory of aging matures *Physiol. Rev.*, 1998, Vol. 78, no 2, pp. 547–581.

9. Osoba I. A. Osoblivosti funkcionuvannja sistemi antioksidantnogo zahistu organizmu. [The features of antioxidant protection system's functioning in the organism] *Ribogospodars'ka nauka Ukraïni — Fisheries Science of Ukraine*, 2009, vol. 1, pp. 133–139.(in Ukrainian).

10. Kagan V. E., Orlov O. N., Prilipko L. L. Problema analiza endogennyh produktov POL. [The problem of analysis of endogenous products of lipid peroxidation]. *Itogi nauki i tehniki VINITI — Results in science and technology VINITI*, 1986, vol. 18, 134 p. (in Ukrainian).

11. Kostjuk V. A. Ustojchivost produktov okislenija lipidov v pecheni krys i puti ih utilizacii. [Stability of the products of lipid oxidation in the liver of rats and pathways of their utilization]. *Biohimija — Biochemistry*, 1986, vol. 51, no. 8, pp. 1392–1397. (In Russian).

12. Starkopf J, Andreasen T. V., Bugge E, Ytrehus K. Lipid peroxidation, arachidonic acid and products of the lipoxygenase pathway in ischaemic preconditioning of rat heart. *Cardiovasc Res.*, 1998, vol. 37(1), pp.66–75.

13. Esterbauer H. Estimation of peroxidative damage. A critical review. *Pathol Biol.* 1996, 44, (1), pp. 25–8.

Стаття надійшла до друку 10.06.2013 р.