

УДК 577.3+535.33

О. І. Доценко

Донецький національний університет

ОСОБЛИВОСТІ РЕАГУВАННЯ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ НИРОК МИШЕЙ НА ДІЮ НИЗЬКОЧАСТОТНОЇ ВІБРАЦІЇ

Досліджено вплив 14-добової вібрації із частотами 8, 16, 24 і 32 Гц, амплітудою $0,8 \pm 0,12$ мм на активність ферментів СОД-каталаза, ферментів системи глутатіону і вміст відновленого глутатіону в гомогенатах тканин нирок мишей. Показано наявність тканинної гіпоксії та зниження кількості відновленого глутатіону в досліджених органах. Проаналізовано зміни активностей окислювальних процесів і ферментів антиоксидантного захисту, виявлено зниження спроможності організму адекватно відповідати на такий стресовий фактор як низькочастотна вібрація.

О. И. Доценко

Донецкий национальный университет

ОСОБЕННОСТИ РЕАГИРОВАНИЯ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ПОЧЕК МЫШЕЙ НА ДЕЙСТВИЕ НИЗКОЧАСТОТНОЙ ВИБРАЦИИ

Исследовано влияние 14-дневной вибрации с частотами 8, 16, 24 и 32 Гц, амплитудой $0,8 \pm 0,12$ мм на активность ферментов СОД-каталаза, ферментов системы глутатиона и содержание восстановленного глутатиона в гомогенатах тканей почек мышей. Показано наличие тканевой гипоксии и снижение количества восстановленного глутатиона в исследуемых органах. Проведенный анализ изменений активностей окислительных процессов и ферментов антиоксидантной защиты свидетельствует о снижении способности организма адекватно отвечать на такой стрессовый фактор как низкочастотная вибрация.

О. I. Dotsenko

Donetsk National University

FEATURES OF ANTIOXIDANT SYSTEM RESPONSE OF MICE KIDNEYS TO THE EFFECT OF LOW-FREQUENCY VIBRATION

Influence of 14-day vibrations of 8, 16, 24 and 32 Hz frequencies with 0.8 ± 0.12 mm amplitude on the activities of SOD-catalase and the glutathione system and on the content of reduced glutathione in mice kidneys homogenates is studied. The tissues hypoxia and decrease of the reduced glutathione in kidneys are shown. Carried out analysis of changes in the oxidizing processes and antioxidant protection enzymes testifies to decrease in capability of an organism to response adequately to such stressful factor as low-frequency vibration.

Вступ

Сучасні технологічні процеси часто супроводжуються шумом і вібрацією – механічними коливаннями, які, розрізняючись за інтенсивністю, можуть негативно впливати на певні органи або на організм у цілому. Сьогодні очевидно, що вібрація

супроводжує не тільки процеси промислового виробництва, вона виникає в транспорті, є складовою будівельних і сільськогосподарських технологій, побутових апаратів. Систематичний, надмірний вплив вібрації на живу систему спричинює виникнення «вібраційної хвороби», яка у структурі професійних захворювань становить 25,8 %. Тому боротьба з вібрацією та шумом розцінюється як одна з найскладніших проблем сучасного життя [2; 12]. Загальна вібрація, на відміну від ряду інших негативних зовнішніх впливів, належить до тих антропогенних факторів, за дії яких тісно поєднуються ефекти від подразнення екстеро-, пропріо- та інтерорецепторів. Таким чином, вплив вібрації на організм складається із прямої та опосередкованої дії на клітини та тканини [8]. Результати багатьох експериментальних робіт підтверджують поширені в останні роки погляди на вібраційний вплив як на варіант мембранопатологічного процесу, що характеризується пошкодженням морфофункціональних властивостей плазматичних мембран і мембран субклітинних структур, викликає порушення функцій мембранозв'язаних ферментів, внутрішньоклітинних органел, накопичення продуктів окиснення білків і ліпідів, зниження активності антиоксидантної системи, системне порушення мікрогемодинаміки [13; 14]. Ряд дослідників виявляє у крові осіб, що зазнали впливу вібрації, антигени печінки, нирок, серця, м'язової, нервової та сполучної тканин, а також високі титри антитіл до цих антигенів [1].

Нирка людини являє приклад складної високодиференційованої системи, різноманіття функцій якої забезпечується високим рівнем інтеграції внутрішньониркових тканинних і органних структур. У ссавців нирка – основний орган, що забезпечує виведення продуктів обміну речовин, чужорідних сполук, електролітів. Вона виконує ендокринну функцію, їй надають важливої ролі у підтриманні гомеостазу організму та забезпеченні його адаптації до умов навколишнього середовища. На цей час накопичилась велика кількість праць про стан процесів ліпопероксидації та антиоксидантного захисту при ураженні нирок, що свідчить про важливу, а іноді визначальну роль оксидативних процесів у враженні ниркової тканини. Це зрозуміло, оскільки посилення оксидативних процесів – універсальний механізм розвитку таких типових патологічних процесів як гіпоксія, запалення, імунний конфлікт й, отже, всіх пов'язаних із ними захворювань нирок. Моноцити та макрофаги, які мігрують до тканин у відповідь на дію імунних комплексів, здатні продукувати активні форми кисню, які поряд з ініціацією синтезу простагландинів з арахідонової кислоти та активацією лізосомальних протеїназ зумовлюють пошкодження базальної мембрани клубочка нирки [4].

Однак у науковій літературі відсутні відомості про вплив вібрації низьких частот на характер розвитку окисно-відновних процесів у тканинах нирок і функціонування систем антиоксидантного захисту цих органів. У зв'язку з цим мета цієї роботи – оцінити вплив вібрації в частотному інтервалі 8–32 Гц, амплітудою $0,8 \pm 0,12$ мм (інтенсивність вібраційного впливу 78–97 Дб) на функціонування двох антиоксидантних систем захисту клітини (супероксиддисмутаза – каталаза й ферментів системи глутатіону тканин нирок мишей).

Матеріал і методи досліджень

Досліди проведені на безпородних мишах-самцях приблизно одного віку й маси, яких утримували в умовах віварію на звичайному раціоні. Тварини були поділені на 5 груп. Тварини I–IV груп піддавалися щоденній 30-хвилинній вібрації із частотами 8, 16, 24 і 32 Гц із постійною амплітудою $0,8 \pm 0,12$ мм продовж 14 діб. Вібрацію спворю-

вали за допомогою електромеханічного перетворювача, підключеного до генератора сигналів низьких частот. Як генератор сигналів використовували звукову карту комп'ютера. Гармонійний сигнал формували за допомогою програми NCH Tone Generator, що дозволяла задавати необхідні параметри вібрації (частоту, амплітуду та форму сигналу), після чого сигнал подавали на підсилювач, потім – на електромеханічний перетворювач. Шумовий ефект максимально нівелювали посиленою фіксацією контейнера для тварин на майданчику вібратора. П'ята група тварин не піддавалася вібрації й використовувалася як контроль. Після останнього впливу вібрацією тварин декапітували з дотриманням вимог Міжнародних принципів Гельсінської декларації про гуманне ставлення до тварин [16] для екстирпації органів. Активність ферментів антиоксидантної системи визначали в гомогенатах тканин нирок. Гомогенати тканин готували на 0,05 М Трис-буфері з pH 7,4.

Активність каталази (КАТ) [КФ 1.11.16] вимірювали за швидкістю утилізації перекису водню (H_2O_2). Кількість H_2O_2 , що залишилась нерозкладеною, визначали за допомогою FOX-реактиву [15].

Для визначення активності супероксиддисмутази (СОД) [КФ 1.15.11] користувалися методом [5], у нашій модифікації. Дослідження активності СОД проводили спектрофотометрично при 406 нм шляхом запису кінетичної кривої, що відбиває реакцію гальмування автоокиснення кверцетину при pH 10. Активність СОД розраховували в мкмоль/(хв·мг білка) [9].

Загальну активність глутатіонредуктази (ГР) [КФ 1.6.4.2] вивчали шляхом реєстрування швидкості окиснення NADPH за присутності окисненого глутатіону (GSSG) при 340 нм [11]. Одночасно реєстрували швидкість окиснення NADPH за відсутності GSSG, що дозволяло врахувати кількість NADPH, що окиснюється NADPH-оксидазою.

Загальну активність глутатіон-S-трансферази (Г-S-T) [КФ 2.5.1.18] визначали методом, принцип якого полягає у ферментативному зв'язуванні відновленого глутатіону із хлор-2,4-динітробензолом з утворенням S-(2,4-динітрофеніл)-глутатіону, що має максимум світлопоглинання при довжині хвилі 340 нм [3].

Активність глутатіонпероксидази (ГП) [КФ 1.11.19] визначали за швидкістю окиснення відновленого глутатіону (GSH) у присутності H_2O_2 [7]. Кількість GSH після зупинки реакції визначали фотометрично (412 нм), використовуючи кольорову реакцію взаємодії SH-груп з 5,5-дитіобіс(2-нітробензойною) кислотою. Кількість відновленого глутатіону визначали за J. Sedlak та R. H. Lindsey, з 5,5-дитіобіс(2-нітробензойною) кислотою. Вміст білка в гомогенатах тканин визначали методом Лоурі.

Статистичний аналіз отриманих результатів проводили в програмі Statistica. Вирогідність відмінностей між середньогруповими показниками оцінювали за допомогою непараметричного рангового критерію Уїлкоксона й однофакторного дисперсійного аналізу.

Результати та їх обговорення

Вібрація в усьому досліджуваному інтервалі частот спричинила до зниження активності СОД у тканинах нирок мишей до рівня нижче контрольного (рис. 1а). Найбільше зниження активності СОД зафіксовано у групах мишей, що перебували в умовах дії вібрації з частотами 8 і 24 Гц (48,5 і 63,2 % відповідно). У групах мишей, що зазнали вібрації з частотами 16 і 32 Гц, зниження активності СОД склало 33,8 і 36,8 % відповідно. Така реакція СОД на дію вібрації може бути пов'язана з ушкодженням молекули ферменту активними продуктами перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ).

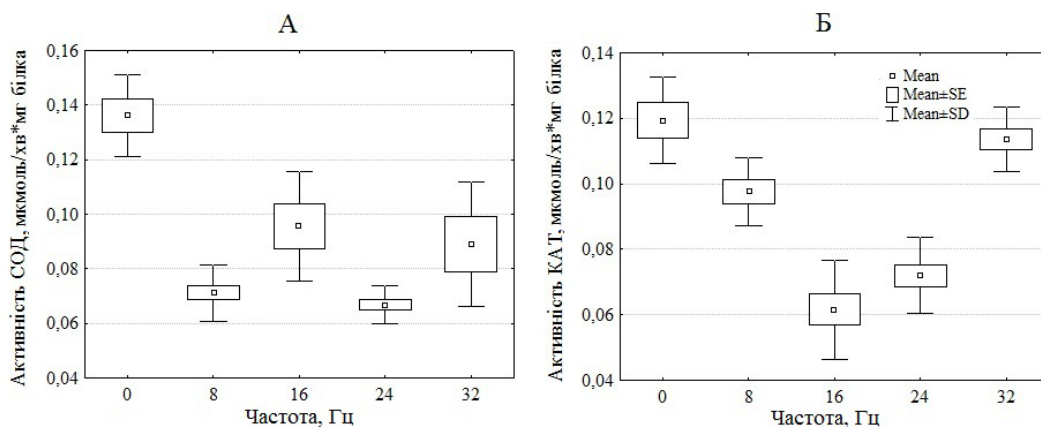


Рис. 1. Зміни активностей СОД (А) та КАТ (Б) у тканинах нирок залежно від частоти вібрації:
 0 – контроль, $\pm SE$ – похибка середнього, $\pm SD$ – середнє квадратичне відхилення

Вібрація з частотою 32 Гц не викликала достовірних змін активності каталази у тканинах нирок (рис. 1б). У той же час, у групах мишей, що зазнали дії вібрації із частотами 8, 16 і 24 Гц, активність каталази в тканинах нирок суттєво знизилася. Зниження активності каталази може бути зумовлене інгібувальною дією вільних радикалів на гемінове залізо активного центру ферменту. З іншого боку, зниження активності каталази може бути пов'язане з недостатньою кількістю субстрату (H_2O_2), що утворюється у супероксидисмутазній реакції, оскільки активність СОД знижується. Це твердження уявляється імовірнішим, оскільки отримані дані свідчать про підвищену активність ГП у тканинах нирок тварин, порівняно з рівнем контролю (рис. 2а). Виняток складає група тварин, що піддавалася дії вібрації з частотою 16 Гц. Для тканин нирок цих тварин активність ГП знижена порівняно з контролем на 33 %. Відомо, що спорідненість ГП до H_2O_2 вища, ніж у каталази, тому ГП ефективніше працює за низьких концентрацій субстрату, тоді як у захисті клітин від окислювального стресу, зумовленого високими концентраціями H_2O_2 , ключову роль відіграє каталаза.

Однак існує думка, що відновлення пероксиду водню може служити додатковим джерелом молекулярного кисню [10]. Каталаза, виконуючи антиоксидантну функцію, компенсаторно підвищує коефіцієнт корисного використання екзогенного кисню в енергетичних цілях унаслідок часткового повернення в метаболічні ланцюги окисного фосфорилування того молекулярного кисню, який відновлюється в організмі одноелектронним шляхом. Розкладання H_2O_2 до O_2 і води в каталазній реакції відбувається з викидом вільної енергії електронів, кінцевим акцептором яких є молекулярний кисень, що використовується в легенях на оксигенацію гемоглобіну або компенсацію гіпоксії у тканинах. Із цього погляду небажаним процесом є перемикання каталазного розкладу H_2O_2 на глутатіонпероксидазне, у ході якого утворюється дві молекули води. У зв'язку із цим зниження активностей каталази та СОД нирок, що відбувається на фоні підвищення активності ГП, свідчить про стан тканинної гіпоксії цих органів.

Зміни активності Г-S-T нирок мишей контрольної та експериментальних груп тварин показано на рисунку 2б. Г-S-T – важливий компонент антиоксидантної ферментної системи, що захищає клітину від несприятливих ефектів переокиснених метаболітів пероксидного стресу. Активність Г-S-T у тканинах нирок після впливу вібрації на всіх досліджуваних частотах вірогідно вища контролю. Суттєве зростання активності цього ферменту (майже удвічі) зафіксовано за дії вібрації з частотою 16 Гц.

Відомо, що Г-S-T індукується токсичними електрофільними метаболітами, тому зростання її активності може свідчити про накопичення останніх у нирках тварин. Оскільки глутатіонтрансфераза при виконанні своїх функцій використовує відновлений глутатіон (GSH) як субстрат, можна чекати зниження вмісту відновленого глутатіону у тканинах нирок мишей. GSH – також субстрат і для ГП, зниження кількості якого може привести до інактивації ферменту. У зв'язку з цим значне підвищення активності Г-S-T у нирках мишей, що піддавалися дії вібрації з частотою 16 Гц, може бути поясненням зниження активності ГП до рівня нижче за контроль.

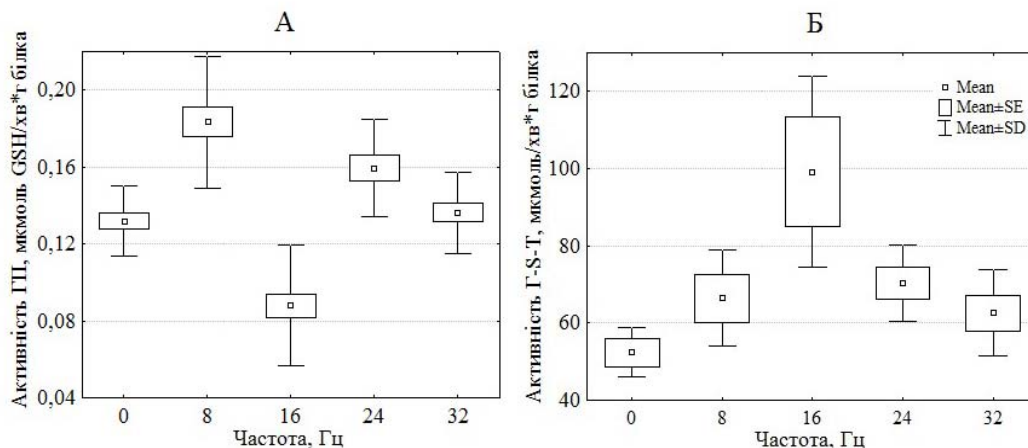


Рис. 2. Зміни активностей ГП (А) та Г-S-T (Б) у тканинах нирок залежно від частоти вібрації: позначення див. рис. 1

Глутатіонредуктаза каталізує оборотне NADPH-залежне відновлення окисненого глутатіону (GSSG). Цей фермент поряд із ГП утворює глутатіонзалежний ферментний ланцюг, що забезпечує руйнування перекисних сполук за механізмом, який не викликає утворення вільних радикалів. Тому для цих ферментів характерна висока позитивна кореляція. Характер змін активності ГР нирок мишей у контрольній та експериментальних групах показано на рисунку 3а.

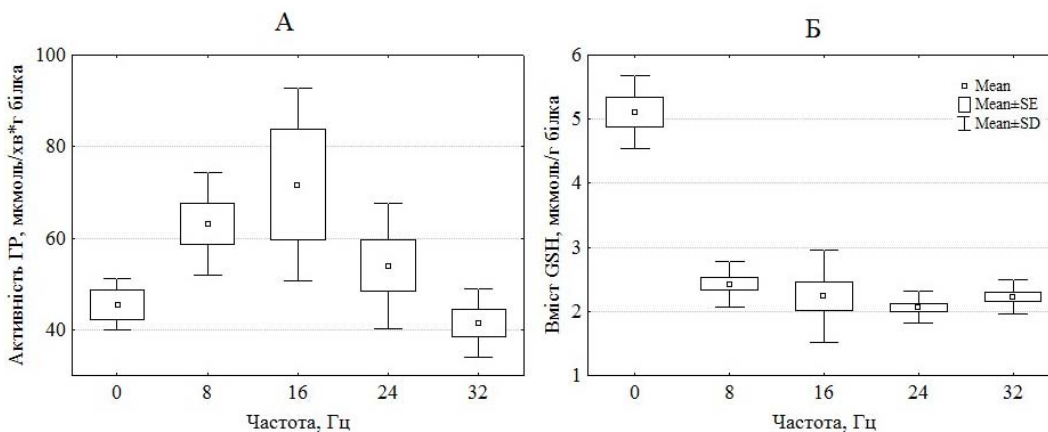


Рис. 3. Зміни активностей ГР (А) та GSH (Б) у тканинах нирок залежно від частоти вібрації: позначення див. рис. 1

Активність цього ферменту у тканинах нирок після впливу вібрації з частотами 8, 16, 24 Гц достовірно вища за контроль, а після впливу з частотою 32 Гц достовірно не відрізняється від контролю. Наведені дані корелюють з активністю ГП. Посилення активності ГП викликає зростання рівня окисненого глутатіону, який відновлюється ГР. Виняток складають дані, отримані для групи тварин, що піддавалися вібрації з частотою 16 Гц. Підвищення активності ГР на 58 % пов'язане зі зниженням активності ГП у нирках цієї групи мишей.

Видно, що вібрація на усіх досліджуваних частотах викликала достовірне зниження відновленого глутатіону у тканинах нирок (рис. 3б). В експериментальних групах вміст GSH знизився від 52,0 % (частота 8 Гц) до 59,7 % (частота 24 Гц). У середньому зниження GSH у нирках мишей склало 55,0 % від рівня контролю. Виявлене нами зниження кількості GSH може бути пов'язане з інтенсивним використанням відновленого глутатіону у метаболічних процесах, зокрема при підвищенні активностей ферментів антиоксидантного захисту (глутатіонпероксидази та глутатіонтрансферази), що відповідає отриманим експериментальним даним. Незважаючи на підвищення активностей ГР і Г-S-T у нирках тварин, що піддавалися дії вібрації з частотою 16 Гц, та зниження активності ГП, виникає дефіцит вмісту GSH. Це дає право припустити, що низькочастотна вібрація впливає на синтез глутатіону, за рахунок чого фіксується значне зниження цього метаболіту у тканинах нирок мишей.

Треба також ураховувати, що GSH – основний компонент редокс-буфера клітини, що стійко підтримує характерне для неї відновлювальне середовище [6]. Зниження вмісту GSH може також свідчити про зниження кількості NADPH, основного відновлювача у клітинах і коферменту багатьох ферментів.

Отримані дані свідчать про порушення здатності організму адекватно відповідати на такий стресовий фактор як вібрація. Про це свідчать різноспрямовані зміни активностей окислювальних процесів і ферментів антиоксидантного захисту тканин при вібраційному впливі різних частот.

Висновки

1. Вібрація із частотами 8–24 Гц викликає зниження активностей СОД і каталази на фоні зростання активностей глутатіонпероксидази та глутатіонтрансферази у тканинах нирок. Наслідок подібної зміни активностей ферментів – зниження кількості екзогенного кисню (тканинна гіпоксія).

2. Певний дисбаланс активностей ферментів системи глутатіону, зокрема за дії вібрації з частотою 16 Гц, дозволяє припустити негативний вплив низькочастотної вібрації на систему синтезу глутатіону у клітинах.

3. Ферменти антиоксидантної системи можуть використовуватися як маркери наслідків оксидантного стресу, викликаного вібрацією.

Бібліографічні посилання

1. **Бобров С. В.** Функциональная морфология и ультраструктурные изменения тимуса при воздействии вибрации и их коррекция с использованием эссенциальных фосфолипидов / С. В. Бобров, А. В. Ефремов, Г. М. Вакулин // Бюлл. СО РАМН. – 2002. – Т. 104, № 2. – С. 129–137.
2. **Итоги** и перспективы научных исследований по проблеме формирования сенсорного конфликта при воздействии шума и вибрации в условиях производства / В. С. Руковишников, В. А. Панков, М. В. Кулешова и др. // Медицина труда и промышленная экология. – 2009. – № 1. – С. 1–5.

3. **Карпищенко А. И.** Глутатионзависимая антиоксидантная система в некоторых тканях крыс в условиях острого отравления дихлорэтаном / А. И. Карпищенко, С. И. Глушков, В. В. Смирнов // Токсикологический вестник. – 1997. – № 3. – С. 17–23.
4. **Король Л. В.** Особливості реагування антиоксидантної системи організму на розвиток захворювань нирок різної етіології / Л. В. Король, Г. Г. Нікуліна, О. В. Стребкова // Український журнал нефрології та діалізу. – 2004. – № 1. – С. 28–30.
5. **Костюк В. А.** Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина / В. А. Костюк, А. И. Потапович, Ж. В. Ковалева // Вопр. мед. химии. – 1990. – № 2. – С. 88–91.
6. **Мартинович Г. Г.** Редокс-гомеостаз клеток / Г. Г. Мартинович, С. И. Черенкевич // Успехи физиологических наук. – 2008. – Т. 39, № 3. – С. 29–44.
7. **Разыграев А. В.** Определение глутатионпероксидазной активности в сыворотке крови человека с использованием пероксида водорода и 5,5-дитиобис(2-нитробензойной) кислоты / А. В. Разыграев, А. В. Арутюнян // Клинич. лаб. диагностика. – 2006. – № 6. – С. 13–16.
8. **Современные лабораторные маркеры ранних стадий вибрационной патологии** / В. А. Кирьяков, Н. А. Павловская, А. В. Сухова, Л. И. Антошина // Вестник РАМН. – 2005. – № 3. – С. 27–30.
9. **Соотношение между величинами активности ферментов антиоксидантной системы в различных тканях интактных крыс** / О. В. Левадная, Г. В. Донченко, В. М. Валущина и др. // Укр. биохим. журн. – 1998. – Т. 70, № 6. – С. 53–58.
10. **Сторожук П. Г.** Ферменты прямой и косвенной антирадикальной защиты эритроцитов и их роль в инициации процессов оксигенации гемоглобина, антибактериальной защите и делении клеток // Вестник интенсивной терапии. – 2003. – № 3. – С. 8–13; № 4. – С. 39–43.
11. **Юсупова Л. Б.** О повышении точности определения активности глутатионредуктазы эритроцитов // Лаб. дело. – 1989. – № 4. – С. 19–21.
12. **Bovenzi M.** A longitudinal study of low back pain and daily vibration exposure in professional drivers // Industrial Health. – 2010. – Vol. 48. – P. 584–595.
13. **Damijan Z.** The effects of low-frequency vibrations on hepatic profile of blood // Eur. Phys. J., Special Topics. – 2008. – Vol. 154. – P. 45–49.
14. **Effects of vibration and resistance training on neuromuscular and hormonal measures** / T. Kvorning, M. Bagger, P. Caserotti, K. Madsen // Eur. J. Appl. Physiol. – 2006. – Vol. 96, N 5. – P. 615–625.
15. **Ou P.** Erythrocyte catalase inactivation (H_2O_2 production) by ascorbic acid and glucose in presence of aminotriazole: Role of transition metals and relevance to diabetes / P. Ou, S. P. Wolf // Biochem. J. – 1994. – Vol. 303. – P. 935–940.
16. **World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects.** – UMS, 2002. – P. 42–46.

Надійшла до редколегії 14.12.2010