

© Куцевляк В.Ф.*, Лахтін Ю.В.*, Макаренко О.А. **.
УДК 577.1:504.054:611.018.54:615.036

ПОРУШЕННЯ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОГО ГОМЕОСТАЗУ У СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ ТА ЙОГО КОРЕКЦІЯ ЗА УМОВ НАДМІРНОГО НАДХОДЖЕННЯ СОЛЕЙ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ

Куцевляк В.Ф. *, Лахтін Ю.В. *, Макаренко О.А. **.

*Харківська медична академія післядипломної освіти, м. Харків

**ДУ «Інститут стоматології АМН України», м. Одеса

В сыворотке крови крыс изучалось содержание диеновых конъюгатов, малонового диальдегида и активность каталазы, супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы при избыточном поступлении солей тяжелых металлов и влияние альфа-липоевой кислоты на эти показатели. Установлено, что соли тяжелых металлов повышают содержание продуктов перекисной окисляции липидов и истощают резервы ферментативной антиоксидантной защиты. Через два месяца приёма альфа-липоевой кислоты нормализуется прооксидантно-антиоксидантный дисбаланс.

Ключевые слова: каталаза, супероксиддисмутазы, глутатионпероксидаза, диеновые конъюгаты, малоновый диальдегид, соли тяжелых металлов, альфа-липоевая кислота.

Вступ

В результаті інтенсивного розвитку промисловості, сільського господарства, транспорту хімічні елементи стали повсюдними забруднювачами навколишнього середовища. Потрапляючи в надлишку в організм людини, вони можуть стати причиною розвитку техногенних гіпермікроелементозів [5].

Детальні дослідження протягом останніх двох десятиліть показали, що різні комбінації солей важких металів (СВМ) мають здатність виробляти в біологічних системах вільні радикали. Порушення гомеостазу іонів металів може призвести до індукції оксидативного стресу з утворенням активних форм кисню і пригніченням системи антиоксидантного захисту (АОЗ) [6, 9].

Для попередження оксидативного стресу запропоновано низку препаратів, які мають антиоксидантні властивості. Аналізуючи дані літератури по антиоксидантам, ми враховували той факт, що індуктором оксидативного стресу виступали СВМ. Саме тому звернули увагу на α -ліпоєву кислоту (ALA). По-перше, вона є важливим компонентом біологічних мембран, захищає їх від перекисного окислення ліпідів (ПОЛ), грає істотну роль в мітохондріальних дегідрогеназних реакціях, будучи ко-фактором таких ферментів, як піруватдегідрогеназа і α -кетоглутаратдегідрогеназа [12], ефективна при лікуванні різних патологічних станів, які супроводжує оксидативне ушкодження [11]. По-друге, ALA здатна створювати міцні хелатні зв'язки з іонами металів і тим самим сприяє детоксикації важких металів [13, 14].

Мета: провести аналіз дисбалансу системи ПОЛ та АОЗ у сироватці крові щурів на тлі сумісної дії солей Fe, Zn, Pb, Cu, Mn, Cr та його корекцію α -ліпоєвою кислотою.

Результати та методи дослідження

Дослідження проводилося на 52 статевозрілих безпородних білих щурах-самцях з вихідною масою 180-200 г. Всі тварини були поділені на 3 групи: I-шу групу (n=21) становили контрольні щури, які отримували питну воду. Тварини II-ї групи (n=14) отримували питну воду з комбінацією СВМ: (ZnSO₄ x 7H₂O) – 5 мг/л, міді (CuSO₄ x 5H₂O) – 1 мг/л, заліза (FeSO₄) - 10 мг/л, марганцю (MnSO₄ x 5H₂O) - 0,1 мг/л, свинцю

(Pb(NO₃)₂) – 0,1 мг/л, хрому (K₂Cr₂O₇) – 0,1 мг/л. Щурам III групи (n=17) крім вищезгаданих СВМ вводили внутрішньошлунково препарат α -ліпоєвої кислоти «Альфа-ліпон» (ВАТ «Київський вітамінний завод», Україна) з розрахунку 100 мг / кг ваги 1 раз на добу. Доступ до води вільний. В кожній групі тварин виводили з експерименту на 30, 60 та 90 добу. Під ефірним наркозом тварин декапітували, проводили забір крові. Вміст дієнових кон'югат (ДК), малонового диальдегіду (МДА), активність ферментів супероксиддисмутазы (СОД), каталази (КТ) та глутатионпероксидази (ГПО) в сироватці крові визначалась в лабораторії біохімії ДУ «Інститут стоматології АМН України» (м. Одеса).

Статистичну обробку матеріалу проводили за параметричними критеріями (середнє значення – М, стандартна похибка – m), статистичну значущість відмінності між показниками двох незалежних груп - непараметричним критерієм (W-критерій Вілкоксона) за допомогою пакету статистичної програми AtteStat 10.8.4. for MS Excel. Статистично значущими вважали відмінності при $p \leq 0,05$.

Під час експерименту лабораторних тварин утримували відповідно до правил, прийнятих Європейською конвенцією із захисту хребетних тварин, яких використовували для експерименту і наукових завдань (Страсбург, 1986 р.) та «Загальних етичних правил експериментів над тваринами», затверджених І Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Результати та їх обговорення

Отримані дані, які подано в таблиці 1, свідчать, що вміст ДК у сироватці крові щурів II групи мав вірогідний ріст у 1,7 рази. Із збільшенням терміна експерименту збільшувався і рівень ДК. На 30 добу його вміст зростав на 70,9% (p=0,02), 60 і 90 добу йшло поступове збільшення на 72,2% (p=0,01) та 83,3% (p=0,03) відповідно від контрольних значень. Динаміка вмісту МДА мала таку ж саму тенденцію, на тлі дії СВМ його концентрація збільшувалась в 1,4-1,5 рази. Після 30 та 60 доби відзначалося статистично значиме збільшення його рівня в порівнянні з контролем на 38,2% (p=0,008) та 37,0% (p=0,005) відповідно і максимальне збільшення на 90 добу – 46,4% (p=0,01).

Таблиця 1
Вміст продуктів ПОЛ у сироватці крові щурів, М±m

Продукти ПОЛ	Доба	Група щурів		
		I n=21	II n=14	III n=17
Дієнові кон'югати, ммоль/л	30	0,86±0,08	1,47±0,17*	1,17±0,12
	60	0,90±0,12	1,55±0,12*	0,97±0,13**
	90	0,90±0,14	1,65±0,08*	1,02±0,06**
Малоновий діальдегід, ммоль/л	30	0,878±0,044	1,213±0,045*	1,116±0,009***
	60	0,911±0,068	1,248±0,028*	1,068±0,038**
	90	0,897±0,060	1,313±0,047*	1,014±0,044**

Примітка. Різниця між групами з вірогідністю $p < 0,05$: *II-I, **III-II, ***III-I

Як бачимо, комбінація солей Fe, Zn, Pb, Cu, Mn, Cr викликала індукцію процесів ліпопероксидації в сироватці крові, що підтверджує наші попередні дослідження стосовно тканин ясен [3]. Основний механізм ініціації процесів ПОЛ цими металами полягає в утворенні супероксидних радикалів, гідроксильних радикалів (в основному по реакції Фентона) та генерації активних форм кисню [9].

У фізіологічних умовах процес пероксидного окислення ліпідів знаходиться під постійним контролем ферментативних і неферментативних антиоксидантних систем клітини. Як відомо, інтенсивність процесів ПОЛ в організмі визначається не тільки факторами, які його ініціюють, але і станом антиоксидантної системи, яка представляє собою сукупність захисних механізмів клітин, тканин, органів і систем, спрямованих на збереження і підтримання гомеостазу в організмі [1]. У відповідь на введення в організм токсичних чинників відбувається активація захисно-компенсаторних

механізмів, що проявляється змінами в активності таких потужних ферментів-антиоксидантів, як СОД, КТ, ГПО. Вони мають певну спеціалізацію по відношенню до конкретних видів радикалів і пероксидів [7].

Дія СВМ малої інтенсивності викликає зниження активності ферментативної ланки системи АОЗ (табл. 2). Активність каталази в сироватці крові щурів під впливом СВМ статистично значуще знижується на 30 добу на 49,9% ($p=0,051$), 60 – на 44,0% ($p=0,003$), 90 – на 49% ($p=0,025$) від контрольної групи. Активність СОД на 30 добу знижалась на 43,2% ($p=0,1$), проте достовірне зниження відбувалось з 60 доби – на 40,7% ($p=0,01$), 90 – на 39,0% ($p=0,02$) від контрольної групи. Серед усіх ферментів АОЗ найменші коливання активності зазнавала глутатіонпероксидаза, її активність в середньому знижувалась лише у 1,2 рази. На 30 добу вживання СВМ рівень активності ГПО зменшився на 7,6% ($p=0,3$), на 60 добу – 17,4% ($p=0,007$), на 90 добу – 14,8% ($p=0,045$) від контролю.

Таблиця 2
Активність ферментів АОЗ в сироватці крові щурів, М±m

Ферменти	Доба	I група n=21	II група n=14	III група n=17
Каталаза, мкат/л	30	0,315±0,031	0,180±0,003*	0,271±0,018**
	60	0,309±0,031	0,173±0,008*	0,288±0,09**
	90	0,314±0,035	0,160±0,012*	0,283±0,030**
Супероксиддисмутаза, у.од./г	30	0,361±0,05	0,205±0,02	0,288±0,02
	60	0,327±0,03	0,194±0,02*	0,303±0,016**
	90	0,328±0,02	0,200±0,03*	0,310±0,02**
Глутатіонпероксидаза, мк-кат/кг	30	1,44±0,04	1,33±0,01	1,48±0,01
	60	1,49±0,05	1,23±0,02*	1,32±0,03**
	90	1,42±0,07	1,21±0,05*	1,40±0,04**

Примітка. Різниця між групами з вірогідністю $p < 0,05$: *II-I, **III-II, ***III-I

Отже, вплив солей Fe, Zn, Pb, Cu, Mn, Cr порушує стаціонарну рівновагу між прооксидантно-антиоксидантною системами у сироватці крові щурів. Це призводить до оксидативного стресу, який може стати причиною структурно-метаболических змін в біомембранах і, згодом, індуктором прогресуючого ушкодження тканин пародонта [10], що підтверджено нашими попередніми дослідженнями [2].

Для корекції порушень, викликаних оксидативним стресом, тваринам вводилась альфа-ліпоєва кислота. Вживання α -ліпоєвої кислоти щурами III групи сприяло спаданню рівня ДК в 1,3-1,6 рази в порівнянні з II групою. Так, на 30 добу відбувалось зниження на 20,4% ($p=0,2$), на 60 – 37,4% ($p=0,02$), 90 – на 38,2% ($p=0,01$). Статистично значиме зниження вмісту ДК у сироватці відбувалось після 60 діб вживання α -ліпоєвої кислоти. Під впливом ALA у щурів III групи знижується рівень МДА у сироватці крові. В порівнянні з II групою він знижувався на 8,0% ($p=0,2$), 14,4% ($p=0,01$), 22,8% ($p=0,01$) відповідно через 30, 60 та 90

діб. Доказове зменшення вмісту МДА у сироватці спостерігалось на 60 добу вживання ALA.

Антирадикальний ефект ALA може бути обумовлений підвищенням ефективності оксидативного фосфорилування [4], вона здатна зв'язувати Cu^{2+} в ліпопротеїнах, інгібуючи Cu -індуковану пероксидацію ліпопротеїнів низької щільності [14] і підсилювати здатність клітин видаляти активні форми кисню [15], а також утворювати міцні комплекси з іонами металів [13].

Не зважаючи на інгібуння процесів ліпопероксидації, вживання α -ліпоєвої кислоти не привело до повернення продуктів ПОЛ до вихідних значень, їх вміст залишався більшим ніж в контролі. Так, рівень ДК на 14,8% ($p=0,03$), а МДА на 17,4% ($p=0,001$) був вищий за контроль.

Вживання α -ліпоєвої кислоти щурами III групи сприяло підвищенню активності всіх ферментів АОЗ. У каталази воно було більше в 1,5-1,8 рази. Причому, із збільшенням терміну вживання ALA її активність збільшувалась. На 30 добу вона була на 50,6%

($p=0,03$), 60 – на 66,5% ($p=0,02$), 90 – на 76,9% ($p=0,01$) вища за щурів II групи. Також підвищувалась активність СОД в 1,4-1,6 раз. Рівень її активності на 40,5% ($p=0,4$), 56,2% ($p=0,008$) та 55,0% ($p=0,03$) був вищим відповідно на 30, 60 та 90 добу спостереження ніж у тварин II групи. Найменше підвищення активності в 1,1-1,2 рази відбувалось у ГПО. Після 30 діб вживання ALA вона на 11,3% ($p=0,2$), 60 діб – на 7,3% ($p=0,01$), 90 діб – на 15,7% ($p=0,007$) була вище за показники у тварин з II групи.

Таке підвищення антиоксидантного потенціалу сироватки крові за рахунок ALA на тлі дії СВМ забезпечено тим, що вона уявляє собою різноспрямований антиоксидант, який може діяти як у водорозчинних, так і у жиророзчинних ділянках клітин і тканин. Крім того, α -ліпоєва кислота допомагає підсилити позитивний ефект інших важливих антиоксидантів в організмі, таких як глутатіон, кофермент Q₁₀, сприяти регенерації вітамінів С і Е [8].

Активність ферментів АОЗ після призначення α -ліпоєвої кислоти також, як і продукти ПОЛ, не повертається до вихідних показників. Хоча рівень активності КТ, СОД і ГПО не досягав значень контрольної групи, проте зниження активності КТ на 8,3% ($p=0,4$), СОД на 10,9% ($p=0,3$) та ГПО на 2,8% ($p=0,3$) не мало статистично значущої різниці. Тобто, можна стверджувати, що ALA сприяла нормалізації системи АОЗ за умов дії СВМ.

Таким чином, за результатами нашого дослідження можна зробити висновки:

1. Комбінація солей Fe, Zn, Pb, Cu, Mn, Cr викликає оксидативний стрес в сироватці крові щурів за рахунок активації процесів пероксидного окислення ліпідів і пригнічення системи антиоксидантного захисту.
2. Вживання альфа-ліпоєвої кислоти нормалізує баланс прооксидантно-антиоксидантної системи за умов дії солей важких металів.
3. Статистично значиме зменшення вмісту продуктів пероксидного окислення ліпідів та підвищення активності ферментів системи антиоксидантного захисту у сироватці крові відбувається через 2 місяця вживання альфа-ліпоєвої кислоти.

Література

1. Курашвили В. А. Новые возможности предотвращения оксидативного стресса / В. А. Курашвили, Л. Майлэм // Журнал натуральной медицины. – 2001. – № 1. – С. 7-14.
2. Куцевляк В. Ф. Макроскопічні і морфометричні зміни в зубоальвеолярних блоках нижньої щелепи щурів при дії

- комбінації солей важких металів / В. Ф. Куцевляк, Ю. В. Лахтін // Український морфологічний альманах. - 2010. - Т. 8, № 3. - С. 69-71.
3. Лахтін Ю. В. Прооксидантний стан в яснах щурів на тлі дії хімічних факторів малої інтенсивності / Ю. В. Лахтін, А. М. Романюк, Є. В. Кузенко // Український медичний альманах. - 2011. - Т. 14, № 3. - С. 94-96.
 4. Лукьянчук В. Д. Фармакологическая коррекция нарушенного энергетического обмена при воспалительно-дистрофическом процессе в пародонте / В. Д. Лукьянчук, О. А. Шпулина // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2006. - Т. 9, № 4. - С. 51-56.
 5. Микроэлементозы человека (этиология, классификация, органопатология) / А. П. Авцын, А. А. Жаворонков, М. А. Риш, Л. С. Строчкова. - М.: Медицина, 1991. - 496 с.
 6. О мембранотропном действии солей тяжелых металлов и основных путях его коррекции / А. Р. Гутникова, К. О. Махмудов, Б. А. Саидханов [и др.] // Токсикологический вестник. - 2009. - № 3. - С. 21-27.
 7. Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная терапия / В. К. Казимирко, В. И. Мальцев, В. Ю. Бутылин [и др.]. - К.: Морион, 2004. - 160 с.
 8. Influence of alpha-lipoic acid on intracellular glutathione in vitro and in vivo / E. Busse, G. Zimmer, B. Schopohl, B. Kornhuber // Arzneimittelforschung. - 1992. - Vol. 42, № 6. - P. 829-831.
 9. Jomova K. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease // K. Jomova, M. Valko // Toxicology. - 2011. - Vol. 283, № 2-3. - P. 65-87.
 10. Lipid peroxidation: a possible role in the induction and progression of chronic periodontitis / C. C. Tsai, H. S. Chen, S. L. Chen [et al.] // Journal of Periodontal Research. - 2005. - Vol. 40, № 5. - P. 378-384.
 11. Lipoic acid and N-acetylcysteine decrease mitochondrial-related oxidative stress in Alzheimer disease patient fibroblasts / P. I. Moreira, P. L. Harris, X. Zhu [et al.] // J. Alzheimers Dis. - 2007. - Vol. 12, № 2. - P. 195-206.
 12. Lipoic acid as a novel treatment for Alzheimer's disease and related dementias / L. Holmquist, G. Stuchbury, K. Berbaum [et al.] // Pharmacol. Ther. - 2007. - Vol. 113, № 1. - P. 154-164.
 13. Lipoic acid: a novel therapeutic approach for multiple sclerosis and other chronic inflammatory diseases of the CNS / S. Salinthon, V. Yadav, D. N. Bourdette, D. W. Carr // Endocr Metab Immune Disord Drug Targets. - 2008. - Vol. 8, № 2. - P. 132-142.
 14. Patrick L. Mercury toxicity and antioxidants: part I: role of glutathione and alpha-lipoic acid in the treatment of mercury toxicity / Lyn Patrick // Alternative Medicine Review. - 2002. - Vol. 7, № 6. - P. 456-471.
 15. The neuroprotective antioxidant α -lipoic acid induces detoxication enzymes in cultured astroglial cells / J. Flier, F. L. Van Muiswinkel, C. A. Jongenelen, B. Drukarch // Free Radic. Res. - 2002. - Vol. 36. - P. 695-699.

Summary

DISORDER OF PROOXIDATIVE-ANTIOXIDATIVE HOMEOSTASIS IN BLOOD SERUM OF RATS AND ITS CORRECTION DURING THE SALTS OF HEAVY METALS EXCESSIVE INFLOW

V.F. Kutzevlyak, Yu.V. Lakhtin, O.A. Makarenko

Key words: catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, diene conjugates, malondialdehyde, salts of heavy metals, alpha lipoic acid.

Blood serum of rats was tested for diene conjugates, malondialdehyde and activity of catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase during excessive inflow of salts of heavy metals; the effect of such salts on alpha lipoic acid was investigated. It was established that salts of heavy metals increase content of lipid peroxidation products and exhaust reserves of enzyme-stipulated antioxidative protection. Two months of administering alpha lipoic acid restore normal prooxidative-antioxidative homeostasis.

Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education, Kharkiv

The State Establishment "The institute of Dentistry of the Academy of Medical Science of Ukraine", Odesa

Матеріал надійшов до редакції 19.04.2012 р.