

Молекулярные механизмы оксидативного стресса в тканях крыс после хронической интоксикации диетическим ацетатом свинца

Г.Р. Оксюзян, Р.М. Симонян, М.А.Бабаян, М.А.Симонян

Институт биохимии НАН РА, Гюмрийский гос.пед.институт им. М.Налбандяна

375014, Ереван, П.Севака, 5/1

Ключевые слова: металлопротеины, интоксикация, ионы свинца

Свинец является широкораспространенным металлом, имеющим высокую токсичность для флоры и фауны в различных экологических зонах земной поверхности, что приводит к проникновению свинца (в виде солей) в кровь и другие ткани животных. Создается необходимость углубленных исследований механизмов токсического воздействия свинца на отдельные компоненты биосистем млекопитающих. Общеизвестно, что одним из путей попадания свинца в организм животных являются сгоревшие энергетические ресурсы углеводородного характера. Свинец в различных количествах присутствует в пище, питьевой и морской воде [8, 16, 24] и в растениях. В зависимости от степени загрязненности местности уровень свинца варьирует в крови животных от 10 до 50 мкг/100 мл крови [18, 21, 25]. В результате этого следы свинца обнаружены в сердечной [7], почечной [22], мозговой тканях [6], оказывая кардио-, нефро- и нейротоксическое воздействие. Токсическое воздействие свинца в этих тканях в большинстве случаев связывается с ослаблением антирадикальной (антиоксидантной) защитной системы [19] с иницированием соответственного уровня оксидативного повреждения клеток этих органов. Нарушаются проницаемость кровь-мозгового барьера [20], функция нейротрансмиттеров [26] и метаболизм нитроксила ($\text{NO}^\bullet$) в ткани почек [12]. Свинец в определенной степени повреждает структуру ДНК дрожжей [23] и снижает эффективность лимфоцитов-киллеров [10, 11]. Снижению токсических эффектов свинца способствуют системы антиоксидантного действия (α -токоферол, аскорбиновая и α -липоевая кислоты и др.) [17–19]. Однако вопрос эффективного устранения токсических воздействий свинца остается нерешенным. Видимо, это обусловлено в основном отсутствием учета того факта, что анти- и прооксидантные системы организма действуют одновременно и взаимообусловленно. Для получения более объективных результатов необходимы исследования с включением систем как анти-, так и прооксидантного действия.

Целью работы является комплексное и одновре-

менное определение молекулярных механизмов оксидативного стресса в тканях крыс, связанных с характерным изменением эндогенного уровня металлопротеинов антиоксидантного и прооксидантного действия и липидной пероксидации при хронической интоксикации ацетатом свинца.

Материал и методы

Сорокапятидневную хроническую интоксикацию белых крыс (самцы, масса 200–250 г) вызывали ежедневной подачей с кормом водной смеси ацетата свинца в расчете в среднем 100 мг в сутки на крысу. Во избежание авитаминоза и других нежелательных факторов, связанных с неполноценным кормлением животных, за 30 дней до начала эксперимента крыс содержали на полноценном рационе. В группу хронической свинцовой интоксикации (ХСИ) вошли 17 крыс, в контрольную – 12 животных. По истечении срока опыта крыс обеих групп декапитировали под легким эфирным наркозом и кровь собирали в отдельные сосуды, используя в качестве антисвертывающего фактора 2% раствор оксалата натрия в объемных отношениях с кровью 1:10. Металлопротеины антиоксидантного действия – МАД (Cu,Zn-супероксиддисмутаза – ССД и каталаза – в растворимой фракции эритроцитов, церулоплазмин (ЦП) и трансферрин (ТФ) – в сыворотке крови) и металлопротеины прооксидантного действия – МПД (цитохромы: b_5 – в растворимой фракции эритроцитов; b_{558I} и b_{558II} – в сыворотке крови; b_{558III} и b_{558IV} – в мембранах эритроцитов; супероксидпродуцирующий липопротеин – супрол – в сыворотке крови) получали методами ионообменной хроматографии (на целлюлозах DE-52 и KM-52 и сефадексе DEAE A-50) и гельфильтрации (на биогеле P-100) [1], исключая использование детергента при солубилизации эритроцитарных мембранных цитохромов b_{558} [2]. Количество полученных металлопротеинов определяли путем вычисления величины плотности характерного для данного белка макси-

мального оптического поглощения, для цитохрома С при 520 нм (окисленная форма), цитохрома b_5 – 525 нм, цитохромов b_{558} – 530 нм, ЦП – 610 нм, ТФ – 470 нм и супрола – 420–430 нм (слабое плечо). Фракции каталазы, цитохрома С и суммарную фракцию Cu, Zn -СОД и Mn -СОД из печени, сердца, почек и мозга крыс получали биотехнологическим методом [3] с использованием дробного осаждения и ионообменной хроматографии. Количество продукта аскорбатзависимой липидной перекисидации – малонового диальдегида (МДА) – определяли спектральным методом [4] в гомогенатах тканей с учетом плотности оптического поглощения при 536 нм. Содержание МДА в гомогенатах тканей (0,5 мл) определяли в расчете на 1 г ткани. СОД-активность фракций и супероксидпродуцирующую активность супрола определяли общеизвестным методом нитротетразолиевого синего (НТС) путем вычисления процента ингибирования (в случае СОД) или процента повышения (в случае супрола) величины плотности оптического поглощения формазана (при 560 нм), который образуется в результате восстановления НТС супероксидными радикалами (O_2^-). За единицу СОД-активности или O_2^- -продуцирующей активности супрола принимали то количество фракции, которое способно ингибировать или стимулировать образование формазана на 50% соответственно. Удельная активность СОД или супрола определялась в расчете на 1 мл эритроцитов или на 1 г ткани и 1 мл сыворотки. Каталазную активность фракций определяли перманганатометрией путем вычисления содержания расщепленной за 1 мин при 20° перекиси водорода. Удельную активность каталазы определяли в расчете на 1 мл эритроцитов или на 1 г ткани.

Оптические спектры поглощения и кинетические кривые определения активности ферментов регистрировали на спектрофотометре "Specord UV, VIS" (Германия) с длиной оптического пути 1 см. В ходе получения и очистки металлопротеинов были использованы стеклянные колонки различных размеров (3x15, 2x10, 1,5x70 см), а также размельчители тканей с оборотом вращения ножей 2000 об/мин. Были использованы также центрифуги К-24 и К-70 (Германия). Статистическую обработку полученных результатов осуществляли общеизвестным методом Стьюдента-Фишера с определением критерия Р.

Результаты и обсуждение

В результате 45-дневной ХСИ гибели животных не наблюдалось, однако эндогенный уровень МАД и МПД изменялся неоднозначно (таблица). Кроме супрола, уровень остальных МПД снижался за исключением сывороточных цитохромов b_{558} , который не изменялся. Уровень же МАД по сравнению с контроль-

Относительные изменения эндогенных металлопротеинов и МДА в тканях в сорокапятидневной хронической интоксикации диетическим ацетатом свинца по сравнению с показателями интактных животных принимаются за 100% ($n=4$, $P<0$).

Металлопротеины		Уровень
К р о в ь	Цитохром b_5	-50,3±8
	Суммарная фракция цитохромов $b_{558}I$ и $b_{558}II$	нет изм.
	Суммарная фракция эритроцитарных мембранных цитохромов $b_{558}III$ и $b_{558}IV$	-22
	Супрол	+87,5±1
	ЦП	нет изм.
	ТФ	нет изм.
	Cu, Zn -СОД	+7
	Каталаза	нет изм.
К р о в ь	Суммарная фракция Cu, Zn -СОД, Mn -СОД	-6
	Каталаза	+70,8±9
	Цитохром С	+76
	МДА	+83,3±12
С е р д ц е	Суммарная фракция Cu, Zn -СОД, Mn -СОД	-66
	Каталаза	нет изм.
	Цитохром С	+50,4±7
	МДА	нет изм.
П о ч к и	Суммарная фракция Cu, Zn -СОД, Mn -СОД	нет изм.
	Каталаза	+14
	Цитохром С	+85,1±10
	МДА	-8
М о з г	Суммарная фракция Cu, Zn -СОД, Mn -СОД	-5
	Каталаза	нет изм.
	Цитохром С	+52
	МДА	+16

ными показателями изменялся незначительно. Суммарный расчетный уровень МПД и МАД вырос всего на 10 и 7% соответственно.

Можно констатировать, что при ХСИ в приведенном режиме в организме наблюдается небольшое увеличение суммарного уровня МПД за счет супрола. Снижение O_2^- -продуцирующей активности супрола при ХСИ свидетельствует о снижении липидной пероксидации супрола и самоактивировании *in vivo* [5]. Падение уровня эритроцитарных мембранных цитохромов b_{558} свидетельствует о снижении стабильности эритроцитарных мембран, новыми структурными элементами которых являются цитохромы b_{558} (эти гемопротейны в основном являются NADPH-зависимыми O_2^- -продуцирующими системами, локализованными в мембранах лимфоцитов или фагоцитирующих лейкоцитов – нейтрализующие антигены продуцированием O_2^- и $NO\cdot$ [9]). Предполагается, что ХСИ вызывает определенный выброс цитохромов b_{558} из эритроцитарных мембран, что может являться результатом повышения липидной пероксидации этих мембран [13]. Фактически при ХСИ уровень ключевых МАД и МПД в крови не претерпевает резких количественных изменений, что может быть результатом противодействия адаптационных механизмов организма против ХСИ.

В печеночной ткани ХСИ приводит к небольшому снижению суммарной фракции Cu, Zn -СОД и Mn -СОД, локализованных в митохондриях клеток. На этом фоне ощутимо повышен уровень каталазы, что свидетельствует о заметном увеличении течения метаболических процессов двухвалентного восстановления молекулярного кислорода с образованием перекиси водорода. Это, в свою очередь, вызывает определенное повышение уровня липидной пероксидации, инициированной не только супероксидными радика-

лами, но и перекисью водорода [13]. В печени животных при ХСИ суммарный уровень факторов прооксидантного действия (МДА и цитохром $C-12\%$) превышает суммарный уровень факторов антиоксидантного действия (СОД и каталаза).

В сердечной ткани суммарный уровень Cu, Zn -СОД и Mn -СОД заметно снижен, а уровень прооксидантных факторов превышает норму на 50,4%.

После 45-дневной ХСИ масса почек увеличилась в 2,1–2,3 раза по сравнению с контрольными показателями. Однако это не сопровождается морфологическими изменениями почек и не вызывает изменения суммарной фракции супероксиддисмутаз. При этом уровень МДА даже несколько снижался, а суммарный уровень прооксидантных факторов на 62% превышал уровень антиоксидантных факторов почек по сравнению с нормой. Повышение веса почек при ХСИ, видимо, обусловлено увеличением масштабов детоксикации организмом свинца.

В мозговой ткани суммарный уровень антиоксидантных факторов ниже прооксидантных на 51%. Эти результаты коррелируют с приведенными в литературе количественными характеристиками факторов, вызывающих оксидативный стресс [15]. Таким образом, оксидативный стресс при ХСИ характеризуется нарушением баланса между эндогенным уровнем МАД, МПД и липидной пероксидацией в крови, печени, мозге, почках и сердце.

Обобщая вышеприведенные результаты, можно констатировать, что в результате ХСИ молекулярные механизмы оксидативного повреждения тканей, связанные с изменением эндогенных уровней ключевых факторов, продуцирующих и утилизирующих активные соединения кислорода, в различных тканях неодинаковы.

Поступила 14.06.02

Օրսիդատիվ պերենսի մոլեկուլային մեխանիզմները առնետների հյուսվածքներում կապարի աղեղատով խրոնիկական թունավորումից հետո

Գ.Ռ.Օրսուգյան, Ռ.Մ.Միմոնյան, Մ.Ա.Բաբայան, Մ.Ա.Միմոնյան

Առնետներին 45 օր տևողությամբ կապարի աղեղատով (կերի հետ, 100 մգ/օր մեկ առնետի հաշվով) հարուցված խրոնիկական թունավորումը հանգեցնում է հյուսվածքներում տարբեր խրոնիկական փոփոխությունների: Վերջինս արդյունք է հյուսվածքներում հակաօքսիդանտային և պրոօքսիդանտային գործողության մեծա-

ղապրոտներին և լիպիդային գերօքսիդացման էմբոզին մակարդակների միջև առկա հաշվեկշռի խախտման, ինչը խորանում է հետազոտված հյուսվածքների (արյուն, լյարդ, ուղեղ, երիկամ, սիրտ) շարքում ձախից աջ ուղղվածությամբ:

The molecular mechanisms of oxidative stress in the rat tissues after chronic lead acetate intoxication

G.R.Oxuzyan, R.M.Simonyan, M.A.Babayan, M.A.Simonyan

The administration of lead acetate (with the food in the dose – 100 mg per day for one rat during 45 days) initiates chronic intoxication, which is expressed by oxidative damage of various depth in tissues. The latter is the result of the shift between the endogenous levels of antioxidant

and prooxidant action metalloproteins and lipid peroxidation, which is increased in the tissues of the investigated organs (blood, liver, brain, kidney, heart) directed from left to right.

Литература

1. Симонян М.А., Симонян Г.М., Мелконян Р.В. Арм.патент, Пром.собств., офиц.бюлл., 1997, N1, с.34.
2. Симонян М.А., Симонян Г.М., Григорян Г.Г., Симонян Р.М. Лицензия изобретения N908, Арм.патент, 2001.
3. Симонян М.А. Открытия, изобретения (СССР), 1988, N28, с.107 AC 1413139.
4. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. ПОЛ в биологических мембранах, М., 1972.
5. Симонян Г.М., Бабалян М.А., Симонян Р.М., Симонян М.А. Биол.ж.Армении, 1999, 52, с.18.
6. Adonaylo V.N., Oteiza P.I. Toxicology, 1999, 135, p.77.
7. Antonowicz-Juchniewicz J. Med.Pr., 1999, 50, p.253.
8. Baron J. Tech.Sci., Methods, 1997, 5, p.47.
9. Batot G., Paclet M.H., Dousi'ere J. et al. Biochim.Biophys.Acta, 1998, 1406, p.188.
10. Boscolo P., DiGioacchino M., Sabbioni E. et al. Met. Ions.Biol.Med.Proc. Int. Symp.5th, 1998; p.435, Ed.by Collyer P.
11. Chen S. Diss.Abstr.Int.B., 1999, 60, p.1054.
12. Dephour A.R., Essalat M., Ala Sh. et al. Toxicology, 1999, 132, p.119.
13. Girotti A.W., Thomas J.P. Biochem.Biophys.Res.Comm., 1984, 118, p.474.
14. Gurer H., Ozgunes H., Oztezcan S., Ezcal N. Free Radical Biol.Med., 1999, 27, p.75.
15. Jindal V., Gill K.D. Pharmacol.Toxicol., (Copenhagen), 1999, 85, p.16.
16. Malecka A., Jarmuszkiewicz W., Tomaszewska B. Acta Biochem.Pol., 2001, 48, p.687.
17. Ma G., Ma Y., Niu J., Zhou Y. Guangdong Weiliang Yuansu Kexue, 1999, 6, p.57.
18. Nashashibi N., Cardamakis E. et al. Gynecol.Obstet.Invest., 1999, 48, p.158.
19. Patra R.C., Swarup D., Dwivedi S.K. Toxicology, 2001, 162, p.81.
20. Ruan S., Gu Z., Lu Ch., Min Z. Zhonghua Laoding Weisheng Zhiyebing Zazhi, 1999, 16, p.339.
21. Saraci M., Ziegler S.K. Chemosphere, 1999, 39, p.689.
22. Witmann F.A., Fult C.D., Grant R.A. et al. Electrophoresis, 1999, 20, p. 943.
23. Yuan X., Tang Ch. J.Environ.Sci.Helth, Part A: Toxic/Hazard Substr. Environ.Eng., 1999, A34, p.1117.
24. Zhai Y., Hao L. Fenxi Huaxue, 2000, 28, p.176.
25. Zhang Z.-N., Bu J.-B. et al. Toxicol.Lett., 1999, 108, p.167.
26. He Y., Xu F., Yang X. Zhonghua Laoding Weisheng Zhiyebing Zazhi, 1999, 17, p.184.