

Ю.І.Губський, член-кор. АМН України, О.В.Задоріна, к.б.н.,
Г.М.Ерстенюк¹, проф., Л.Ф.Осинська, к.б.н.

ВПЛИВ УНІТІОЛУ НА ОКИСНЮВАЛЬНУ МОДИФІКАЦІЮ БІЛКІВ ПЛАЗМИ КРОВІ ТА ПРОЦЕСИ ПЕРОКСИДАЦІЇ ЛІПІДІВ МЕМБРАН ГЕПАТОЦИТІВ ЩУРІВ ЗА УМОВ ІНТОКСИКАЦІЇ ХЛОРИДОМ КАДМІЮ

Національний медичний університет імені О.О.Богомольця, м.Київ,
¹Івано-Франківський державний медичний університет

Суттєвий внесок у забруднення навколишнього середовища і порушення екологічної рівноваги вносять важкі метали, до числа яких відноситься кадмій, який чинить токсичний вплив на організм людини та тварин [1-3]. Важкі метали характеризуються високою токсичністю і біохімічною активністю, що дозволяє відносити їх до екоцидних та біоцидних ксенобіотиків. В останні десятиріччя кадмій став одним із широко розповсюджених забруднювачів навколишнього середовища та найбільш небезпечних токсикантів. Кадмій надходить в організм людини з різних джерел, включаючи повітря, їжу і воду [3]. Джерелами викидів кадмію в атмосферу є теплові електростанції, природний газ і нафта, а також продукти переробки нафти. Cd^{2+} у великих кількостях нагромаджується в листі тютюну, що визначає його високу концентрацію у тютюновому димі. Кадмій широко використовується в промисловості: виробництві металокераміки, полімерів, люмінофорів для кольорових телевізорів і рентгенівських екранів, штучної шкіри тощо. Солі кадмію надходять в організм людини через слизові оболонки дихального, травного тракту та шкіру [3,4]. Іони кадмію накопичуються у високих концентраціях і довго депонуються в печінці та нирках, що пояснюється високим вмістом в них транспортного білка — металотіонеїна, який містить велику кількість тіоло-

вих груп [3,4]. Встановлено, що надходження в організм надлишкових кількостей кадмію та інших важких металів стимулює індуктивний синтез специфічних лігандів — металотранспортних білків, зокрема металотіонеїнів.

Метою нашого дослідження було вивчення окиснювальної модифікації білків плазми крові та процесів пероксидації ліпідів в мембранах печінки щурів за умов отруєння хлоридом кадмію та корекції унітіолом.

Матеріали та методи дослідження
Досліди проводили на щурах лінії Вістар масою 150-200 г. Кадмієву інтоксикацію викликали введенням хлориду кадмію щурам з розрахунку 1200 мкг/кг маси тіла щура внутрішньов'язово протягом 10 днів. Щурі були розподілені на три групи: 1 — контроль, 2- тварини, яким вводили хлорид кадмію, 3 — хлорид кадмію + унітіол. Лікування проводили 5% унітіолом в дозі 0,3 мл на щура протягом 14 днів. Матеріал для дослідження забирали під легким ефірним наркозом на 14 добу після завершення введення хлориду кадмію. Виділення еритроцитів та плазми крові проводили за методом [5], виділення мітохондрій клітин печінки проводили за методом диференційного центрифугування [6], мікосомальної фракції — методом ультрацентрифугування [7]. Визначення НАДФН-залежного, аскорбат-залежного і неініційованого пероксидного окислення

ліпідів (НЗП, АЗП та НІ ПОЛ, відповідно) проводили по накопиченню малонового діальдегіду (МДА), який визначали по реакції з тіобарбітуровою кислотою (ТБК) [8] з деякими модифікаціями: депротейнізацію і зупинку реакції ПОЛ проводили додаванням суміші 10% трихлороцтової кислоти (ТХО) і 10^{-2}M ЕДТА [9]. Окиснювальну модифікацію білків плазми крові щурів визначали за реакцією з 2,4-динітрофенілгідразином (2,4-ДНФГ). Ступінь ОМБ оцінювали за вмістом альдегідо- і кетопохідних білків нейтрального та основного характеру [10,11].

Статистичну обробку одержаних даних проводили варіаційно-статистичним методом з використанням критерію "t" Стьюдента.

Результати та їх обговорення
Одержані дані вказують на те, що за умов хронічної кадмієвої інтоксикації спостерігається інтенсифікація процесів пероксидного окиснення ліпідів в мітохондріях та мікосомальній фракції клітин печінки (табл. 1-3). Як видно з результатів дослідження, в мітохондріях та мікосомальній фракції клітин печінки відбувається достовірна активація неініційованого, НАДФН- та аскорбат-залежного пероксидного окиснення ліпідів (табл.1,2). В мітохондріях клітин печінки відбувається активація НАДФН-залежного ПОЛ в 1,8 рази, аскорбат-залежного ПОЛ — в 2,2 рази, неініційованого ПОЛ — в 1,8 рази порівняно з контрольною групою (табл.1). В мікосомальній фракції клітин печінки за умов хронічної інтоксикації хлоридом кадмію НЗП активується в 1,6 рази, АЗП — в 1,8 рази, НІ ПОЛ — в 1,7 рази порівняно з контролем (табл.2).

Відомо, що завдяки фізико-хімічним властивостям як кислоти Льюїса (тобто акцептора електронів) кадмій здатен до ковалентного зв'язування з SH-групами, що зумовлює його біохімічну токсикологію як тіолової отрути з вираженими мембранотропними ефектами [3]. Блокування SH-груп відновленого глутатіону та ферментів антиоксидантної дії є біохімічною основою прооксидантної дії солей кадмію, що при отруєннях призводить до функціональної недостатності антиоксидантного захисту. У результаті таких порушень збіль-

шується нагромадження активних форм кисню, що, в свою чергу, стимулює інтенсивність процесів пероксидації ліпідів. Відомо, що активація реакцій пероксидації ліпідів є одним з фундаментальних біологічних механізмів пошкодження біоструктур і розвитку клітинної

патології [1,8,12-15]. У зв'язку з цим, пошук і використання методів лікування токсичних уражень печінки є одним із важливих завдань медицини. До препаратів, що використовуються при отруєннях солями важких металів, у тому числі кадмію, відносять унітіол [2,16-18].

Таблиця 1

Вплив унітіолу на процеси пероксидного окиснення ліпідів в мітохондріях клітин печінки щурів за умов кадмієвої інтоксикації (M±m, n=10)

Характер дослідження	НЗП, нмоль МДА/мг білка·30 хв	АЗП, нмоль МДА/мг білка·30 хв	НІ ПОЛ, нмоль МДА/мг білка·30 хв
Контроль	160,3±10,3	122,6±7,9	86,8±2,8
CdCl ₂	292,0±29,6*	265,4±14,0*	158,2±18,8*
CdCl ₂ + унітіол	190,2±12,8**	148,3±5,0**	102,9±4,9**

Примітки в цій та табл. 2 і 3: * — P<0,05 порівняно з контролем;
** — P<0,05 порівняно з групою отруєних Cd Cl₂ щурів.

Таблиця 2

Вплив унітіолу на процеси пероксидного окиснення ліпідів в мікросомальній фракції клітин печінки щурів за умов кадмієвої інтоксикації (M±m, n=10)

Характер дослідження	НЗП, нмоль МДА/мг білка·30 хв	АЗП, нмоль МДА/мг білка·30 хв	НІ ПОЛ, нмоль МДА/мг білка·30 хв
Контроль	198,7±4,3	159,2±8,6	107,3±4,2
CdCl ₂	314,0±8,4*	292,5±14,8*	182,0±10,7*
CdCl ₂ + унітіол	230,1±13,0**	180,9±6,3**	113,9±8,0**

Таблиця 3

Вплив унітіолу на окиснювальну модифікацію білків плазми крові за умов кадмієвої інтоксикації (M±m, n=10)

Показники	Контроль	Хлорид кадмію	Хлорид кадмію + унітіол
Кислоторозчинні пептиди (довжина хвилі λ=270 нм), моль/кг	0,400±0,018	0,503±0,020*	0,422±0,019**
Альдегідо- і кетопохідні нейтрального характеру (довжина хвилі λ=370 нм), моль/кг	0,379±0,021	0,450±0,018*	0,402±0,009**
Альдегідо- і кетопохідні нейтрального характеру (довжина хвилі λ=430), моль/кг	0,297±0,011	0,352±0,015*	0,261±0,012**

Показання до застосування останнього за даної патології визначаються його непрямыми антиоксидантними властивостями та безпосереднім зв'язуванням токсичних агентів у неактивні сульфокон'югати [16].

Проведені нами дослідження засвідчують, що введення унітіолу щурам, отруєним хлоридом кадмію, сприяє нормалізації активованих ксенобіотиком реакцій вільнорадикального окиснення в мітохондріях та мікросомальній фракції клітин печінки (табл.1,2). За умов введення унітіолу відбувається зниження НАДФН — залежного ПОЛ в мітохондріях клітин печінки щурів, отруєних хлоридом кадмію, на 35%, аскорбат-залежного ПОЛ — на 44%, неініційованого ПОЛ — на 35% порівняно з групою тварин, отруєних хлоридом кадмію, і достовірно не відрізняється від контролю (табл.1).

В мікросомальній фракції клітин печінки за умов корекції унітіолом також відбувається зниження активованих ксенобіотиком процесів пероксидації ліпідів до нормальних величин: НАДФН-залежне ПОЛ знижується на 27%, аскорбат-залежне ПОЛ — на 38%, неініційоване ПОЛ — на 37% порівняно з групою тварин отруєних хлоридом кадмію (табл.2).

За сучасними уявленнями [1,13,19], активні форми кисню (АФК), які накопичуються при патологічних станах, можуть викликати окиснювальне руйнування і модифікацію не тільки ліпідів, але й білків і нуклеїнових кислот. Окиснювальну модифікацію білків (ОМБ), яка має місце в органах і тканинах людини і тварин за умов норми і різко зростає під дією окиснювального стресу, в останні роки тільки починають вивчати [2,11,16.19].

В результаті наших досліджень показано, що за умов хронічної інтоксикації хлоридом кадмію відбувається достовірне зростання рівня кислоторозчинних пептидів, аліфатичних кетон-динітрофенілгідрозонів нейтрального та основного характеру в плазмі крові щурів (табл.3). Вміст кислоторозчинних пептидів в плазмі крові щурів за цих умов збільшується на 25,7%, альдегідів та кетопохідних нейтрального характеру — на 18,7

%, альдегідів та кетонів основного характеру — на 18,5 %. Одержані дані щодо змін в ступені ОМБ плазми є показником пошкодження білків тканин за умов кадмієвої інтоксикації. ОМБ при отруєннях кадмієм може бути за рахунок дії АФК, які надходять у плазму з печінки та еритроцитів [2,19,20], а також органічних радикалів, що утворюються під час процесів пероксидного окиснення ліпідів та зниження систем антиоксидантного захисту.

Одержані дані змін окиснювальної модифікації білків плазми крові є показником пошкодження білків тканин за умов хімічного ураження, що корелює з активацією процесів пероксидації ліпідів, зміною жирнокислотного спектру ліпідів та зниженням стану антиоксидантної системи в мембранах клітин печінки, що було показано нами раніше [15].

Як видно з табл. 3, введення отруєним тваринам унітіолу протягом

14 днів супроводжувалось зниженням вмісту альдегідо- і кетопохідних нейтрального та основного характеру та кислоторозчинних пептидів в плазмі крові на 8,5; 25,5; 16,1 % порівняно з нелікованими. Використання унітіолу з метою корекції за умов отруєння хлоридом кадмію обумовлено тим, що кадмій є інактиватором тіолових груп і має виражену мембранолітичну дію, а унітіол має антидотну властивість: він здатний зв'язувати кадмій і тим самим зменшує його токсичну дію, виступає в ролі донатора сульфгідрильних груп, проявляючи властивості антиоксиданта [18]. Таким чином, унітіол нормалізує в організмі активовані за дії хлориду кадмію процеси пероксидації ліпідів та білків.

Висновки

1. Кадмієва інтоксикація супроводжується інтенсифікацією процесів пероксидного окиснення

ліпідів в мітохондріях та мікросомальній фракції клітин печінки шурів. При цьому відбувається достовірна активація неініційованого, НАДФН- та аскорбат-залежного пероксидного окиснення ліпідів.

2. За умов кадмієвої інтоксикації відбуваються зміни ступеню окиснювальної модифікації білків, а саме: зростання рівня кислоторозчинних пептидів, аліфатичних кетон-динітрофенілгідразонів нейтрального та основного характеру в плазмі крові шурів.
3. Введення унітіолу шурам, отруєним хлоридом кадмію, протягом 14 днів сприяє нормалізації активованих ксенобіотиком реакцій вільнорадикального окиснення в мітохондріях та мікросомальній фракції клітин печінки, а також корегує окиснювальну модифікацію білків плазми крові.

ЛІТЕРАТУРА

1. Губський Ю.И., В.Б.Долго-Сабуров, В.В.Храпак/Химические катастрофы и экология.-Київ: "Здоров'я", 1993.- 220 с.
2. Ерстеньюк Г.М., Губський Ю.И., Брюзгіна Т.С., Задоріна О.В. Окиснювальна модифікація білків і жирнокислотний склад плазми крові шурів за умов інтоксикації кадмієм //Наукові записники ТДПУ. Серія Біологія.-2004.-№3-4 (24).- С.84-87.
3. Нейко Є.М., Губський Ю.И., Ерстеньюк Г.М. Інтоксикація кадмієм: токсикокінетика і механізм біоцидних ефектів (огляд літератури і власних досліджень) // Журн.АМН України.-2003.-Т.9,№2.- С.250-261.
4. Лужников Е.А. Клиническая токсикология.- Москва: "Медицина", 1994.- 254 с.
5. Ангельські С., Якубовські З., Домінічак М.Г. Клінічна біохімія.- Сопот, 1998.-452 с.
6. Ещенко Н.Д. Выделение митохондриальной и цитоплазматической фракций тканей для анализа активности ферментов / Методы биохим.исследований (липидный и энергетический обмен). Под ред М.И.Прохоровой.- М.:Изд-во ЛГУ,1982.- 272 с.
7. Карузина И.И., Арчаков А.И. Выделение микросомной фракции и характеристика ее окислительных систем / Совр.-методы в биохимии.- М.:Медицина, 1977.- С.49-62.
8. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.-М.: "Наука",1972.-243 с.
9. Губський Ю.И.,Дунаєв В.В., Беленічев І.Ф. та ін. Методи оцінки антиоксидантних властивостей фізіологічно-активних сполук при ініціюванні вільнорадикальних процесів у досліді in vitro / Метод.рекомендації Держфармцентру МОЗ України.-Київ, 2002.-26 с.
10. Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А., Поротов И.Г. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения // Вопр. мед.химии.- 1995.- Т.41,№1.- С.24-26.
11. Мешишен І.Ф. Метод визначення окислювальної модифікації білків плазми (сироватки) крові // Буковинський мед.вісн.- 1998.- Т.2,№1.- С.156-158.
12. Губський Ю.И. Коррекция химического поражения печени.-Київ: "Здоров'я", 1989.- 168 с.
13. Губський Ю.И. Токсическая гибель клетки: свободно-радикальное повреждение и апоптоз //Лікування та діагностика.-2001.-№4.-С.8-15.
14. Левицкий Е.Л., Губський Ю.И. Свободнорадикальные повреждения ядерного генетического аппарата клетки // Укр.биохим. журн. — 1994. — Т.66, №4. — С. 18-30.
15. Задоріна О.В., Яницька Л.В., Осинська Л.Ф., Стеченко О.В. Стан ферментів антиоксидантної системи та окиснювальна модифікація білків за умов токсичного ураження / Матеріали ІХ Укр. біохім.з'їзду, 24-27 жовтня 2006 р.- Харків.-2006.- Т.2.- С.56-57.
16. Гонський Я.І., Кубант Р.М., Корда М.М., Шуліга О.В. Корекція унітіолом порушень вільнорадикальних та енергозабезпечувальних процесів у шурів з токсичним ураженням печінки // Медична хімія.- 2002.- Т.4, №1.- С.46-49.
17. Карп В.К., Данова І.В. Унітіол -антидот токсичних металів// Ліки.- 1997.- №6.- С. 60-64.
18. Максимов Ю.Н., Краснюк Е.П., Овруцкий В.М. и др. Антидотная эффективность ресинтезированного унитиола // Совр. пробл. токсик.- 2000.- №1.- С.34-37.
19. Мешишен І.Ф., Польовий В.П. Механізм окиснювальної модифікації білків // Буковинський мед. вісн.- 1999.- Т.3,№1.- С.196-205.
20. Davies K. J. A., Delsignore M. E., Lin S. W. Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids // J. Biol. Chem. -1987.- Vol. 262,№ 20.-P. 9902-9907.

*Ю. И. Губский, О. В. Задорина,
А. М. Эрстениук, Л. Ф. Осинская*

**ВЛИЯНИЕ УНИТИОЛА НА ОКИСЛИТЕЛЬНУЮ
МОДИФИКАЦИЮ БЕЛКОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ
И ПРОЦЕССЫ ПЕРОКСИДАЦИИ ЛИПИДОВ
МЕМБРАН ГЕПАТОЦИТОВ КРЫС В
УСЛОВИЯХ ИНТОКСИКАЦИИ ХЛОРИДОМ
КАДМИЯ**

В условиях хронической кадмиевой интоксикации наблюдается интенсификация процессов пероксидации липидов в митохондриальной и микросомальной фракциях клеток печени крыс. Кадмиевая интоксикация приводит к изменениям степени окислительной модификации белков, а именно: увеличения уровня кислоторастворимых пептидов, алифатических кетон-динитро-фенилгидразонов нейтрального и основного характера в плазме крови крыс.

Введение унитиола крысам, отравленным ксенобиотиком на протяжении 14 дней, приводит к нормализации активированных ксенобиотиком реакций свободнорадикального окисления в митохондриальной и микросомальной фракциях клеток печени, а также окислительной модификации белков плазмы крови.

*J.I. Gubsky, O.V. Zadorina,
A.M. Ersteniuk, L.F. Osynska*

**AN INFLUENCE OF UNITIOL ON PROTEINS
OXIDATIVE MODIFICATION IN BLOOD PLASM
AND PROCESSES OF LIPIDS PEROXIDATION OF
MEMBRANES HEPATOCYTES IN RATS UNDER
INTOXICATION WITH CADMIUM CHLORIDE**

Under conditions of chronic cadmium intoxication the intensification of the processes of lipids peroxidation in mitochondrial and microsomal fractions of rats liver cells can be observed. Cadmium intoxication leads to changes of the degree of proteins oxidative modification, particularly, increasing in level of acid solvied peptides, neutral and basic aliphatic keto-dinitrophenilhydrosones in rats blood plasm.

Infusion of unitiol in rats, which have been poisoned with xenobiotic, during 14 days leads to normalisation of free radical oxidative reactions activated with xenobiotic in mitochondrial and microsomal fractions of liver cells, and also oxidative modification of the blood plasm proteins.