

ГЛУТАТИОНОВА СИСТЕМА ЕРИТРОЦИТІВ ЩУРІВ, ІНТОКСИКОВАНИХ ХЛОРПІРИФОСОМ

Ю.Салига, В. Росаловський, Р. Федяков

*Інститут біології тварин НААН
вул. Стуса, 38, Львів 79034, Україна
e-mail: yursalyha@yahoo.com*

Вивчали вплив хлорпірифосу – токсичної фосфорорганічної сполуки на зміни показників глутатионової системи еритроцитів щурів через різні періоди після його введення тваринам. Встановлено динаміку змін вмісту відновленого глутатіону, активностей глутатіонредуктази, глутатіонпероксидази і глутатіон-S-трансферази в еритроцитах через 1, 3, 6 і 10 діб після надходження досліджуваного ксенобіотика в організм. Виявлені зміни вказаних вище показників свідчать про активну участь глутатионової системи у процесах детоксикації організму після отруєння хлорпірифосом, яке супроводжується оксидативним стресом.

Ключові слова: хлорпірифос, антиоксидантна система, глутатіон відновлений, глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза, глутатіон-S-трансфераза, еритроцити, токсичність.

Хлорпірифос відомий перш за все як діюча речовина багатьох розповсюджених інсектицидів широкого спектру дії. За своєю хімічною будовою це фосфорорганічна сполука – О,О-діетил-О-3,5,6-трихлор-2-піридилфосфотіоат ($C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$). Хлорпірифос інгібує холінестеразні ензими, спричиняючи, зокрема, розлади синаптичної передачі, що до недавнього часу вважалося ключовим і практично єдиним механізмом його токсичності. Останніми роками у світі інтенсифікувалися роботи з вивчення біологічної безпеки застосування низки пестицидів з антихолінестеразними властивостями, зокрема фосфорорганічних. Завдяки цьому були виявлені нові шляхи і способи їх дії на живий організм. Так було встановлено, що хлорпірифос спричиняє виникнення оксидативного стресу, який сам по собі є вагомим фактором токсичності.

Варто наголосити, що у медичній токсикології проблема вискоєфективного лікування отруєнь фосфорорганічними сполуками (ФОС) є далека від вирішення. Крім того, протягом останнього десятиліття вчені з'ясували, що ризики і небезпека для здоров'я людей від застосування ФОС, у тому числі хлорпірифосу, є значно більшими, ніж вважалося раніше [7]. Отже, вивчення впливу цієї речовини на різні біохімічні процеси організму є перспективним і актуальним. Система глутатіону пов'язує всі ланки біохімічних механізмів детоксикації ліпофільних і гідрофільних ксенобіотиків, які функціонують як єдине ціле. Участь глутатіону і зв'язаних з ним систем у процесах біотрансформації та детоксикації ксенобіотиків можна розглядати як один із елементів загальних механізмів, що визначають стійкість організму до токсичної дії ксенобіотиків. Аналіз даних літератури свідчить про те, що рівень GSH, активності ГПО, ГР, Г-S-T – ензимів синтезу і катаболізму GSH можуть використовуватись як критерії оцінки токсичної дії ксенобіотиків різної хімічної природи [1, 2, 8]. Метою даної роботи було дослідити у часовій динаміці стан окремих параметрів глутатионової системи (вміст відновленого глутатіону (GSH), активність глутатіонпероксидази (ГПО), глутатіонредуктази (ГР) і глутатіон-S-трансферази (Г-S-T)) в еритроцитах щурів за умов їх токсичного ураження, викликаного хлорпірифосом.

Матеріали та методи

Дослідження були проведені на 40 самцях білих нелінійних лабораторних дорослих щурів масою від 180 до 240 г, яких утримували в умовах віварію на стандартному раціоні з необмеженим доступом до питної води. Формування груп тварин проводили за принципом аналогів з урахуванням їх віку і маси. З метою вивчення токсичних властивостей хлорпірифосу тваринам дослідної групи одноразово внутрішньоочеревино вводили цей препарат у розрахунку 30 мг/кг маси тіла. Контрольним тваринам замість хлорпірифосу вводили аналогічний об'єм фізіологічного розчину. Забій тварин проводили методом декапітації під легким ефірним наркозом через 1, 3, 6 і 10 діб після введення токсину. Під час проведення досліджень на тваринах дотримувалися принципів біоетики, законодавчих норм і вимог згідно з положенням «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей» (Страсбург, 1986) і «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Зразки гепаринізованої крові центрифугували при 3000 об/хв упродовж 15 хв на центрифугі MLW T23D (Німеччина). Після відділення плазми еритроцити тричі промивали 0,9% розчином NaCl. Гемолізати отримували шляхом трикратного заморожування-відтавання водних суспензій еритроцитів з подальшим їх центрифугуванням при 8000 об/хв протягом 15 хв на центрифугі MLW T23D (Німеччина).

Вміст відновленого глутатіону (GSH) визначали за рівнем утворення тіонітрофенільного аніону в результаті взаємодії SH-груп глутатіону з 5,5-дитіобіс-2-нітробензойною кислотою [6]. Активність глутатіонпероксидази (КФ 1.11.1.9) визначали за швидкістю окислення відновленого глутатіону до і після інкубації з гідропероксидом третинного бутилу за допомогою кольорової реакції з 5,5-дитіобіс-2-нітробензойною кислотою (ДТНБК), внаслідок чого утворюється забарвлений продукт – тіонітрофенільний аніон [4]. Активність глутатіонредуктази (КФ 1.6.4.2) визначали за зниженням вмісту NADPH при 37°C протягом 1 хв, вимірюючи оптичну проникність за допомогою спектрофотометра СФ-26 при довжині хвилі 340 нм [3]. Активність глутатіон-S-трансферази (КФ 2.5.1.18) визначали за швидкістю утворення кон'югату в реакції з 1-хлор-2,4-динітробензолом, який характеризується максимумом поглинання при довжині хвилі 340 нм [5].

Одержані результати обробляли статистично за допомогою комп'ютерної програми OriginPro 8 з використанням t-критерію Стьюдента. Вірогідно різними вважалися результати при $P < 0,05$.

Результати і їхнє обговорення

Проведені нами дослідження дали змогу простежити основну динаміку змін показників глутатіонової антиоксидантної системи в еритроцитах через 1, 3, 6 і 10 діб після введення дослідним тваринам хлорпірифосу. Як видно з представлених на рис. 1 даних, за дії хлорпірифосу спостерігається значне (майже втричі) зниження вмісту відновленого глутатіону в еритроцитах щурів дослідної групи вже на першу добу експерименту. На 3-тю добу дослідного періоду вміст трипептиду в еритроцитах тварин, яким вводили вказаний токсикант, залишався і надалі, на низькому рівні і становив 41,2% від контрольного значення. Поступове зниження вмісту GSH в еритроцитах свідчить, очевидно, про його інтенсивне споживання у реакціях детоксикації. Варто зазначити, що відновлений глутатіон є основним антиоксидантом еритроцитів; він відіграє роль коферменту при відновленні метгемоглобіну у функціонально активний гемоглобін. Крім того, за його участю здійснюється детоксикація цілої низки токсичних сполук, ксенобіотиків, а також H_2O_2 і

гідроперекисів ліпідів, які утворюються у реакціях взаємодії активних форм Оксигену з ненасиченими жирними кислотами мембрани еритроцитів [1]. Таким чином відновлений глутатіон відіграє важливу роль у збереженні функціональних характеристик мембран еритроцитів. Зниження вмісту GSH у еритроцитах, встановлене у ході наших досліджень, можна пояснити його кон'югацією з продуктами метаболізму хлорпірифосу, а також використанням у процесах біохімічних перетворень активних форм Оксигену (АФО), які, як свідчать дані наукової літератури, індуються за умов токсичної дії хлорпірифосу на біологічні системи [8]. Ще однією причиною зниження вмісту відновленого глутатіону в гемолізатах еритроцитів тварин дослідної групи може бути дестабілізаційний вплив досліджуваного нами токсиканта на ензими, які беруть участь у підтриманні його фізіологічного рівня.

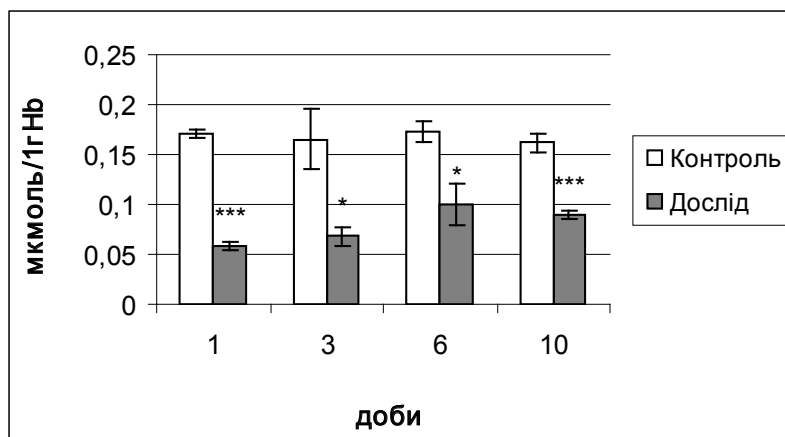


Рис. 1. Вміст відновленого глутатіону в еритроцитах щурів за дії хлорпірифосу. На рис. 1–4: * – вірогідність відмінностей у значеннях показників між контрольною та дослідними групами тварин (* – *** $p < 0,05$ - $p < 0,001$; $p < 0,05$ - *, $p < 0,01$ - **, $p < 0,001$ - ***).

Глутатіонредуктаза (ГР) відновлює дисульфідний зв'язок окисленого глутатіону (GSSG) до його сульфгідрильної форми (GSH) [1]. Результати наших досліджень свідчать, що поряд зі зниженням концентрації GSH, за умов інтоксикації хлорпірифосом, спостерігаються зміни в активності ГР (рис. 2). Зокрема, аналіз динаміки цього ензиму за умов токсичного ураження організму тварин, викликаного досліджуваним препаратом, показує, що активність ГР знижувалась на початковому етапі експерименту (1-ша і 3-тя доба), а до значень, притаманних тваринам контрольної групи, наближалась на 6-ту – 10-ту доби експерименту. Відомо, що ГР є ензимом, залежним від NADPH, активність якого пригнічується у разі накопичення окисленої форми нуклеотиду (NADP). Тому причиною раннього зниження глутатіонредуктазної активності еритроцитів за дії хлорпірифосу може бути зниження вмісту NADH і NADPH. Нормальне функціонування у клітині NADPH-залежної глутатіонредуктази є дуже важливим для запобігання окисному ушкодженню мітохондрій, які неспроможні синтезувати GSH *de novo* і тому залежать від інтенсивності відновлення глутатіонредуктазою окисненого глутатіону та його надходження з цитозолу крізь зовнішню мітохондріальну мембрану. У той самий час виявлене через 6–10 діб після введення хлорпірифосу підвищення активності ГР і уповільнення падіння рівня GSH у еритроцитах можна розглядати як компенсаторні зміни, спрямовані на відновлення функціонування антиоксидантної системи глутатіону в клітинах.

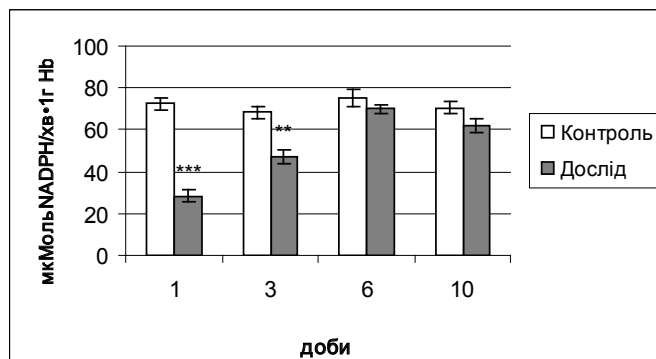


Рис. 2. Активність глутатіонредуктази в еритроцитах щурів за дії хлорпірифосу.

Не менш важливим ферментом глутатіонової системи є глутатіонпероксидаза, що є гомотетрамерним селенопротеїном, який каталізує відновлення H_2O_2 , або органічних гідроперексидів і внаслідок цього захищає клітини від дії реактивних форм Оксигену. Результати проведених досліджень показали (рис. 3), що активність ГПО в еритроцитах щурів після введення досліджуваного токсиканта, починаючи з 1-ї доби, була нижчою у тварин дослідної групи порівняно з тваринами контрольної групи. На 3-тю добу після введення хлорпірифосу ці різниці були найбільш суттєвими. Не виключено, що поступове зниження глутатіонпероксидазної активності в еритроцитах у період з 1 до 3 доби зумовлене вичерпанням доступного пулу GSH та накопиченням продуктів ліпопероксидації. Таке припущення підтверджується даними, представленими на рис. 3, згідно з якими активність глутатіонредуктази – ензиму, відповідального за поповнення внутрішньоклітинного пулу відновленого глутатіону, – є зниженою на 1-шу та 3-тю доби після дії хлорпірифосу (рис. 2). Це узгоджується з думкою про те, що тривала активація ГПО можлива лише за умови підтримання достатньо високого рівня внутрішньоклітинного GSH, який виконує роль не лише субстрату реакцій, але й фактора, необхідного для постійного відновлення розміщених у каталітичному центрі ензиму селенольних груп, що окислюються у процесі глутатіонпероксидазної реакції [2]. Починаючи з 6-ї доби, активність ГПО у тварин дослідної групи почала зростати, і на 10-ту добу різниці між контролем і дослідом практично не було.

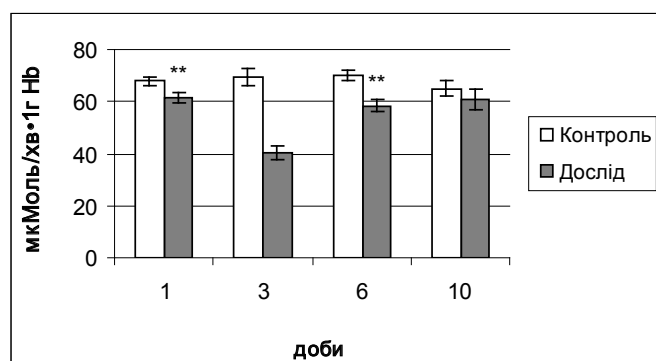


Рис. 3. Активність глутатіонпероксидази в еритроцитах щурів за дії хлорпірифосу.

Що стосується глутатіон-S-трансферази (ГТ), то слід відзначити, що це ензим, який каталізує реакцію кон'югації глутатіону з цілою низкою ксенобіотиків і токсинів, зокрема

багатьох пестицидів. Ксенобіотик, пов'язаний із ГТ, поступово інактивується і виводиться, не пошкоджуючи клітини. Принципово важливою є наявність ГТ в еритроцитах. Це відкриває можливість детоксикації екзогенних гідрофільних сполук уже на перших етапах їх проникнення в організм. Як показали результати наших досліджень (рис. 4), на початкових етапах дослідного періоду спостерігається достовірне зростання активності цього ферменту, а на 6-ту добу у тварин дослідної групи ГТ інгібується на 53%. Це можна пояснити збільшенням навантаження, при якому індукується цитохром P 450 і ГТ. Це супроводжується зниженням рівня GSH, який інтенсивно використовується як агент кон'югації.

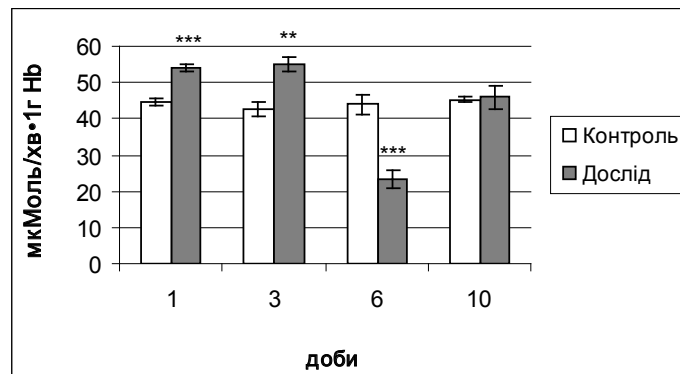


Рис. 4. Активність глутатіон-S-трансферази в еритроцитах щурів за дії хлорпірифосу.

Таким чином, у результаті роботи були отримані дані з динаміки змін основних параметрів глутатіонової системи в еритроцитах протягом перших десяти діб постінтоксикаційного періоду отруєних хлорпірифосом щурів, яка свідчить про активну участь глутатіонової системи у процесах детоксикації.

Виявлено дефіцит ресурсів глутатіонової системи антиоксидантного захисту внаслідок її виснаження протягом 10 діб після інтоксикації організму хлорпірифосом.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Барабой В. А. Биоантиоксиданты. К.: Книга плюс, 2006. 462 с.
2. Кулинский В. И., Колесниченко Л. С. Структура, свойства, биологическая роль и регуляция глутатионпероксидазы // Успехи совр. биологии. 1993. Т. 113. Вып. 1. С. 107–121.
3. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині / В.В. Влізла, Р.С. Федорук, І.Б. Ратич та ін.; за ред. В. В. Влізла. Львів: Сполом, 2012. 762 с.
4. Моун В. М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах // Лаб. дело. 1986. Т. 12. С. 724–727.
5. Habig W. H., Pabst M. J., Jacoby W. B. Glutathin-S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation // J. Biol. Chem. 1974. Vol. 249. N 22. P. 7130–7139.
6. Hissin P. J., Hilf R. A. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues // Analyt. Biochem. 1976. Vol. 74. P. 214–226.
7. Needham L. L. Assessing exposure to organophosphorus pesticides by biomonitoring in epidemiologic studies of birth outcomes // Environ. Health Persp. 2005. Vol. 113. N 4. P. 494–498.
8. Salyha Y. Biological effects assessment of chlorpyrifos and some aspects of its neurotoxicity // Visnyk of Lviv University. Biology series. Is. 54. Lviv. 2010. P. 3–14.

9. Carlberg I., Mannervik B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver // J. Biol. Chem. 1975. Vol. 250. P. 5475–5480.

Стаття: надійшла до редакції 31.08.12

доопрацьована 17.10.12

прийнята до друку 23.10.12

GLUTATHIONE SYSTEM IN ERYTHROCYTES OF RATS INTOXICATED BY CHLORPYRIFOS

Yu. Salyha, V. Rosalovsky, R. Fedyakov

*Institute of Animal Biology NAAS
38, Stus St., Lviv 79034, Ukraine
e-mail: yursalyha@yahoo.com*

We studied the influence of chlorpyrifos – toxic organophosphorus compound on changes of the glutathione system in erythrocytes of rats through different periods after the introduction of animals. Dynamics in changes of reduced glutathione content, activities of glutathione reductase, glutathione peroxidase and glutathione-S-transferase in erythrocytes after 1, 3, 6 and 10 days after receipt of the xenobiotic was analysed. Revealed changes in above parameters indicate an active role of glutathione system in detoxification processes after the chlorpyrifos poisoning, accompanied with an oxidative stress.

Keywords: chlorpyrifos, antioxidant system, glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione-S-transferase, erythrocytes, toxicity.

ГЛУТАТИОНОВАЯ СИСТЕМА ЭРИТРОЦИТОВ КРЫС, ИНТОКСИЦИРОВАННЫХ ХЛОРПИРИФОСОМ

Ю.Салыга, В. Росаловский, Р. Федяков

*Институт биологии животных НААН
ул. Стуса, 38, Львов 79034, Украина
e-mail: yursalyha@yahoo.com*

Изучали влияние хлорпирифоса – токсического фосфорорганического соединения – на изменения показателей глутатионовой системы эритроцитов крыс через различные периоды после его введения животным. Установлена динамика изменений содержания восстановленного глутатиона, активностей глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы в эритроцитах через 1, 3, 6 и 10 суток после введения исследуемого ксенобиотика в организм. Выявленные изменения указанных выше показателей свидетельствуют об активном участии глутатионовой системы в процессах детоксикации организма после отравления хлорпирифосом, которое сопровождается окислительным стрессом.

Ключевые слова: хлорпирифос, антиоксидантная система, глутатион восстановленный, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, глутатион-S-трансфераза, эритроциты, токсичность.