



УДК: 577.3 + 615.9

ЗМІНА ІНТЕНСИВНОСТІ ЛІПОПЕРОКСИДАЦІЇ Й АКТИВНОСТІ ФЕРМЕНТІВ СИСТЕМИ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ У ТКАНИНІ НИРОК ПТИЦІ ЗА ДІЇ ГІПОХЛОРИТУ НАТРІЮ РІЗНИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ

Н. П. Головчак¹, Г. І. Коцюмбас², М. Б. Галан¹, М. Я. Бойко¹, Д. І. Санагурський¹

¹Львівський національний університет імені Івана Франка,
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: golovchak_nataly@ukr.net

²Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій
імені С. З. Гжицького
вул. Пекарська, 50, Львів 79010, Україна

За дії гіпохлориту натрію (ГХН) у концентрації 5 мг/л відбувається посилення інтенсивності процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) навіть після реабілітаційного періоду (на 20-ту добу досліду), тоді як дія ферментів антиоксидантної системи (АОС) стає неузгодженою. ГХН концентрацією 10 мг/л призводить до зростання процесів ліпопероксидації на 7-му добу досліду з подальшим зниженням вмісту ТБК-активних продуктів порівняно зі сьомою добою дії ГХН. Проте активність ферментів АОС зростає впродовж усього досліду.

Ключові слова: перекисне окиснення ліпідів, супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіонпероксидаза, гіпохлорит натрію, нирки.

ВСТУП

Нирки відіграють важливу роль у підтриманні гомеостазу, який у нормі характеризується сталістю об'єму рідин (ізvoleмією), їх осмотичної концентрації (ізотонією), іонного складу (ізоіонією), концентрації іонів водню (ізогідрією). Тому ті чи інші порушення діяльності нирок можуть викликати вторинні зміни зазначених показників. Не менш важливою є роль нирок щодо виведення з організму продуктів азотистого обміну, токсичних речовин. Відповідно порушення екскреції речовин є одним із основних проявів ниркової недостатності у разі безпосереднього ушкодження нирок, а також унаслідок дії позаниркових факторів. Нирки є найважливішим не тільки екскреторним, а й інкреторним органом, що бере участь у регуляції тону судин (ренін-ангіотензинова система, простагландини) та еритропоезу (еритропоетин, інгібітор еритропоезу). З цим пов'язана висока частота розвитку і важкий перебіг гіпертензивного й анемічного синдромів в умовах патології нирок [3]. З огляду на вищезазначене, дослідження впливу різних чинників на функціональні параметри ниркової тканини є важливим завданням біохімії, молекулярної біології, біофізики.

На сьогоднішній день у медицині широко використовується розчин ГХН як детоксикант. ГХН, отриманий електрохімічним методом із водних розчинів хлористого натрію, є найбільш зручним і фізіологічним джерелом активного кисню. Він нетоксичний, легко віддає активний кисень, виводиться з організму, має невелику молекулярну масу та малі розміри, завдяки чому без перешкод проходить крізь клітинні мембрани. ГХН може окислювати токсини, які містяться не лише у крові, але і в тканинах, модулюючи роботу цитохрому Р-450, який локалізований у мембранах ендоплазматичної сітки печінки, нирок та інших органів. Розчин ГХН дедалі частіше починають застосовувати для профілактики інтоксикацій організму [2, 6, 7]. Проте на сьогодні залишається невідомою дія розчину ГХН на прооксидантно-антиоксидантний гомеостаз тканин не ураженого токсинами організму, оскільки відомо, що за дії різних екстремальних факторів (токсини, шкідливі продукти обміну речовин організму, стресові чинники) відбувається посилення вільнорадикальних реакцій [8]. Тому вивчення впливу ГХН на здоровий організм, а саме на прооксидантно-антиоксидантний стан нирок є актуальною проблемою сьогодення.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проводили на курах породи Леггор віком 140–145 днів. Кури домашні (*Gallus gallus domesticus*) належать до класу Птахів, ряду Куриних.

Клінічні дослідження піддослідних і контрольних тварин проводили за загальноприйнятими методами, враховуючи фізіологічний стан.

Дослідження відбувалося за такою схемою. Тварин розділили на 3 групи по 15 голів у кожній. Перша група слугувала контролем. Тваринам другої та третьої груп упродовж 14 днів замінювали випоювання води високоочищеним розчином ГХН у концентрації 5 та 10 мг/л відповідно. Після 14-го дня досліду по 5 тварин із кожної групи залишали на реабілітацію, яка тривала 6 днів.

На 7, 14 і 20-ту доби досліду по 5 тварин із першої, другої та третьої груп декапітували під легким ефірним наркозом з дотриманням вимог Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, яких використовують з експериментальною та науковою метою (Страсбург, 1986). Видаляли нирки і заморожували у рідкому азоті, де зберігали до проведення досліджень. Наважки тканин (~1 г) гомогенізували при низькій температурі на гомогенізаторі Поттера-Ельвегейма у присутності буферного розчину (0,32 М сахароза, 1 мМ ЕДТА, 50 мМ трис-НСІ, рН = 7,4) [11]. 1 мл гомогенату кожної проби заморожували в морозильній камері при -20°C, які в подальшому використовували для дослідження. Кількість білка в кожному зразку визначали за методом Лоурі [15].

У відібраних зразках визначали інтенсивність процесів ПОЛ за тестом з 2-тіо-барбітуровою кислотою (ТБК), використовуючи метод Р. Р. Тимирбулатова і виражали у мікромолях ТБК-активних продуктів з розрахунку на 1 мг тканини [13]. Також визначали активність ферментів АОС – супероксиддисмутази (СОД) за методом В. А. Костюка [5], каталази (КАТ) за методом М. А. Корольок [4] та глутатіонпероксидази (ГПО) за методом В. М. Моїна [10].

Активність СОД вимірювали за реакцією з кверцетином. Активність КАТ визначали за здатністю пероксиду водню утворювати зі солями молібдену стійкий забарвлений комплекс.

Мірою активності ферменту ГПО є швидкість окиснення глутатіону в присутності гідропероксиду третинного бутілу. Концентрацію відновленого глутатіону до

і після інкубації визначали колориметрично. В основі розвитку кольорової реакції лежить взаємодія SH-груп із 5,5' дитіо-біс (2-нітробензойною) кислотою (ДТНБК) з утворенням забарвленого продукту – тьонітрофенільного аніона. Кількість останнього прямо пропорційна кількості SH-груп, які прореагували із ДТНБК.

Статистичну обробку усіх результатів досліджень проводили з використанням програми „Excel-2003” для Windows.

Для оцінки достовірності різниці між статистичними характеристиками двох альтернативних сукупностей даних обраховували коефіцієнт Стьюдента. Достовірною вважалася різниця при показнику достовірності $p \geq 0,95$ (або рівні значимості $P < 0,05$), $p \geq 0,99$ (або рівні значимості $P < 0,01$), $p \geq 0,999$ (або рівні значимості $P < 0,001$). Результати обробки представлені у вигляді рисунків.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

Нами встановлено, що дія ГХН призводить до посилення процесів ліпопероксидації у нирках. Застосування досліджуваного розчину в концентрації 5 мг/л незначно посилює інтенсивність процесів ПОЛ на 7-му добу досліду (на 32%), проте на 14-ту добу відбувається значна інтенсифікація вільнорадикальних реакцій, про що свідчить підвищення вмісту ТБК-активних продуктів на 191% щодо контролю ($p \geq 0,999$). Така значна кількість ТБК-активних продуктів зберігається у тканині нирок і після реабілітаційного періоду (рис. 1). Ймовірно, у нирках на 7-му добу досліду за низьких концентрацій ГХН (5 мг/л) не активувалися адаптаційні процеси під дією стрес-фактора. Відомо, що ГХН також здійснює окислення продуктів ПОЛ, тому можна припустити, що низькі концентрації ГХН призводять до активації процесів ліпопероксидації без вторинного окиснення продуктів ПОЛ.

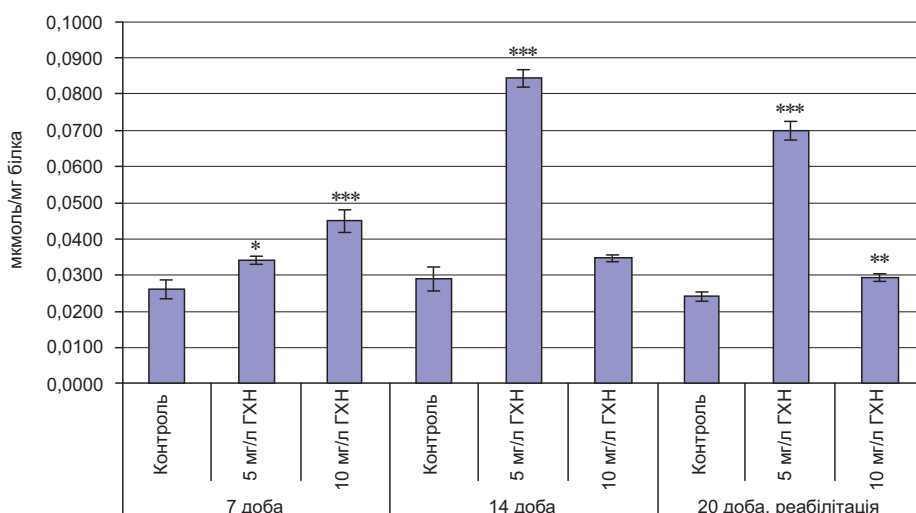


Рис. 1. Вміст ТБК-активних продуктів у нирках за дії ГХН у концентраціях 5 мг/л та 10 мг/л на 7-му, 14-ту і 20-ту (реабілітація) доби досліду (* – $p \geq 0,95$; ** – $p \geq 0,99$; *** – $p \geq 0,999$)

Fig. 1. Content of TBA-active products in kidney tissue under the actions of sodium hypochlorite in concentrations 5 mg/l and 10 mg/l on the 7, 14 and the 20 (rehabilitation) day of testing (* – $p \geq 0,95$; ** – $p \geq 0,99$; *** – $p \geq 0,999$)

При вивченні дії розчину ГХН у концентрації 10 мг/л нами відзначено достовірне зростання інтенсивності процесів ПОЛ на 7-му добу досліду (на 73%), тоді як на 14-ту і 20-ту (реабілітація) доби інтенсивність вільнорадикальних реакцій знижується щодо інтенсивності процесів ліпопероксидації на 7-му добу, проте вміст ТБК-активних продуктів не досягає контрольних значень. Ймовірно, таку динаміку інтенсивності процесів ліпопероксидації можна пояснити реагуванням АОС на окисну дію високих концентрацій ГХН, оскільки вже з 7-ї доби відбувається адаптація тканини нирок, спрямована на відновлення прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу. ГХН у вищій концентрації (10 мг/л), ймовірно, здійснює окиснення не тільки ліпідів мембран, а й продуктів ПОЛ. Тому інтенсивність процесів вільнорадикальних реакцій є нижчою, ніж у випадку дії ГХН концентрацією 5 мг/л (рис. 1).

В основі розвитку вільнорадикальних реакцій лежить порушення рівноваги між антиоксидантними та прооксидантними системами організму, що може призвести до руйнування мембран клітин. АОС захисту організму контролює і гальмує всі етапи вільнорадикальних реакцій, починаючи від їхньої ініціації та закінчуючи утворенням гідропероксидів і ТБК-активних продуктів [1, 14]. На підвищення вмісту вторинних продуктів ліпопероксидації на 7-му добу дії розчину ГХН у концентрації 5 мг/л реагує АОС захисту, і активність ферменту СОД зростає на 39% (рис. 2). Проте вже на 14-ту добу досліду відбувається інтенсифікація процесів ПОЛ (вміст ТБК-активних продуктів зростає на 191%), тоді як активність СОД спадає на 77% нижче контролю, а активність КАТ зростає на 8% із рівнем достовірності $p \geq 0,999$. Хоча активність КАТ незначно зростає, проте активність ГПО (конкуруючий фермент за H_2O_2) зростає на 166% (рис. 2–4). З огляду на те, що ГПО нейтралізує не тільки H_2O_2 , а й первинні продукти ліпопероксидації, ймовірно, відбувається знешкодження гідропероксидів ферментом ГПО, і тому активність КАТ знижується, а активність ГПО зростає [9]. Після реабілітаційного періоду на 20-ту добу досліду інтенсивність

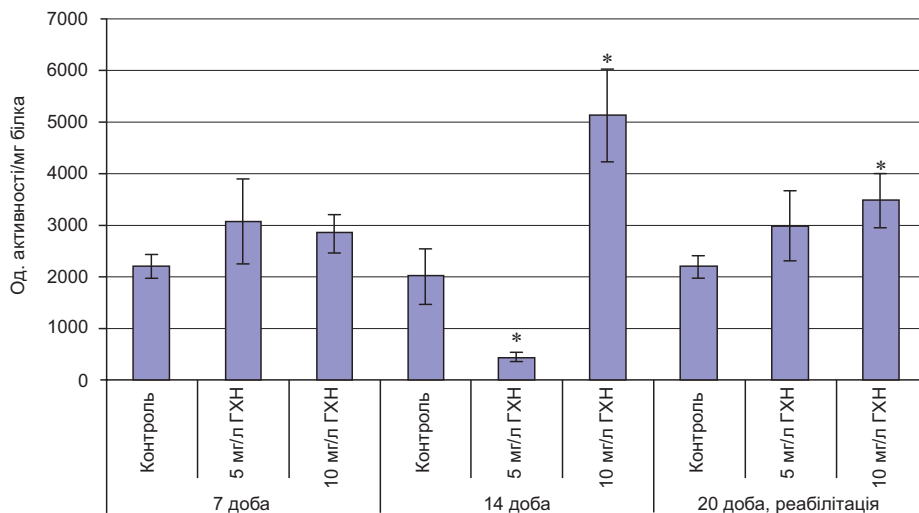


Рис. 2. Активність СОД у нирках за дії ГХН у концентраціях 5 мг/л та 10 мг/л на 7-му, 14-ту і 20-ту (реабілітація) доби досліду (* – $p \geq 0,95$)

Fig. 2. Superoxide dismutase activity in kidney tissue under the actions of sodium hypochlorite in the concentrations 5 mg/l and 10 mg/l on the 7, 14 and the 20 (rehabilitation) day of testing (* – $p \geq 0.95$)

процесів ліпопероксидації залишається на рівні 14-ї доби, активність СОД зростає на 36%, КАТ – на 11% ($p \geq 0,999$) щодо контрольних значень, проте активність ГПО достовірно знижується на 35%, що свідчить про порушення прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу тканини нирки навіть під час припинення введення в організм розчину ГХН (рис. 2–4). Відомо, що окиснення ненасичених жирних кислот мембран клітин супроводжується утворенням поперечних зшивок „ліпід-білок”, що веде до порушення будови плазматичної мембрани, а також і до руйнування органел клітин, тому різні чинники, дія яких супроводжується окисненням мембран, є вкрай небажаними для організму. Крім того, вже доведено, що ГХН окислює ароматичні амінокислоти, пептиди, поліненасичені жирні кислоти, нуклеїнові кислоти.

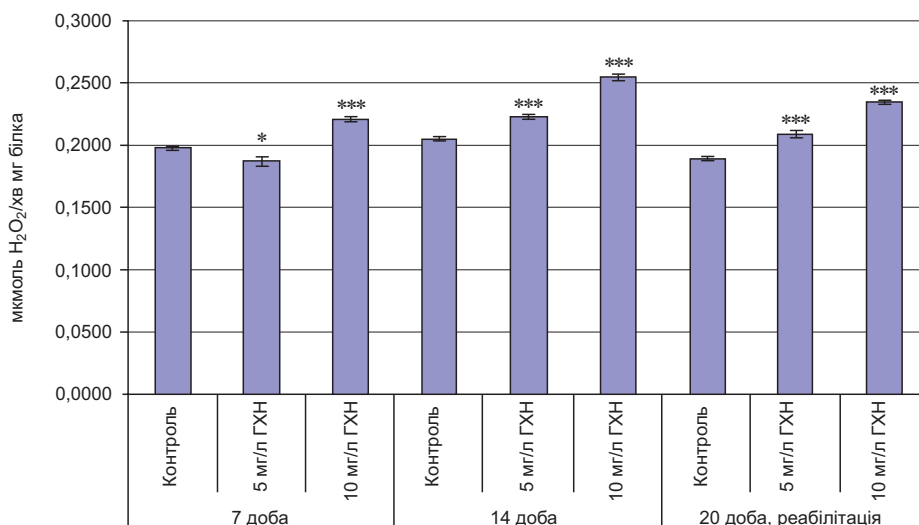


Рис. 3. Активність КАТ у нирках за дії ГХН у концентраціях 5 мг/л та 10 мг/л на 7-му, 14-ту і 20-ту (реабілітація) доби досліді (* – $p \geq 0,95$; *** – $p \geq 0,999$)

Fig. 3. Catalase activity in the kidney tissue under actions of sodium hypochlorite in the concentrations 5 mg/l and 10 mg/l on the 7, 14 and the 20 (rehabilitation) day of testing (* – $p \geq 0.95$; *** – $p \geq 0.999$)

При застосуванні розчину ГХН у концентрації 10 мг/л на 7-му добу досліді нами встановлено, що на фоні підвищення вмісту ТБК-активних продуктів відбувається активація СОД, КАТ і ГПО (рис. 2–4). На 14-ту добу відбувається уповільнення інтенсивності процесів ПОЛ, тоді як активність СОД зростає аж на 155%. У відповідь на таке зростання активності досліджуваного ферменту відбувається також і достовірне зростання активності КАТ на 24% ($p \geq 0,999$), яка знешкоджує утворений у процесі реакції дисмутації H_2O_2 . У літературі зустрічається твердження, що ГХН позитивно впливає на АОС через посилення відновлювальної модифікації дисульфідних груп [7]. За час реабілітації інтенсивність процесів ПОЛ залишається на позначці 14-ї доби, активність СОД знижується щодо показників 14-ї доби дії ГХН (зростає на 59% щодо контролю), а активність КАТ залишається на рівні 14-ї доби, проте активність ГПО зростає на 44%. Ймовірно, вища концентрація ГХН інтенсивною ініціацією процесів ПОЛ (на 7-му добу досліді) зумовлює менш слабку (порівняно з 5 мг/л) активацію ключового ферменту антиоксидантної системи – СОД, чим не призводить до виснаження ферментативної ланки захисту організму.

ГХН у концентрації 5 мг/л, навпаки, на початкових етапах виснажує АОС нирки, і на 14-ту добу ми спостерігаємо різке підвищення інтенсивності процесів ПОЛ і спад активності СОД. Є відомості, що ГХН здатний окислювати ліпіди ліпопротеїдів, причому цей процес відбувається з пригніченням утворення вільних радикалів [7]. Найбільше піддаються гіпохлорит-індукованому переокисненню ліпопротеїни дуже низької густини, найменше – ліпопротеїни високої густини [12]. Тому можна припустити, що вища концентрація ГХН призупиняє у нирках значне зростання вмісту ТБК-активних продуктів через пригнічення утворення вільних радикалів та знешкодження самих вторинних продуктів ПОЛ.

ГХН є джерелом іона Na^+ , який є основним катіоном позаклітинної рідини (135–155 ммоль/л у плазмі крові). Він практично не надходить у клітини, отже, визначає осмотичний тиск плазми й інтерстиціальної рідини. При втраті іонів Na^+ з'являється „осмотично вільна” вода, частина якої може надходити у клітини внаслідок різниці осмотичного тиску (осмотичний градієнт), що призводить до набряку клітин. У кінцевому результаті зменшується об'єм позаклітинного водного сегмента, у тому числі й об'єм крові. Надлишок Na^+ зумовлює затримання додаткової кількості води, що збільшує позаклітинний простір і спричинює формування набряків [3].

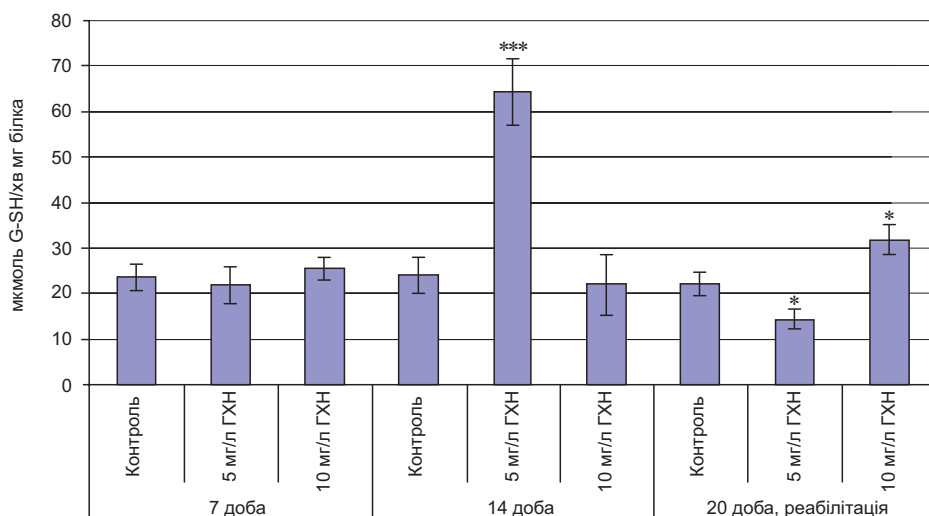


Рис. 4. Активність ГПО у нирках за дії ГХН у концентраціях 5 мг/л та 10 мг/л на 7-му, 14-ту і 20-ту (реабілітація) доби досліді (* – $p \geq 0,95$; *** – $p \geq 0,999$)

Fig. 4. Glutathionperoxydase activity in kidney tissue under the actions of sodium hypochlorite in the concentrations 5 mg/l and 10 mg/l on the 7, 14 and the 20 (rehabilitation) day of testing (* – $p \geq 0,95$; *** – $p \geq 0,999$)

Відомо, що нирки беруть участь у підтриманні кислотно-основної рівноваги крові шляхом реабсорбції основних еквівалентів і виведення кислих іонів, а це сприяє підтриманню рН крові у стабільних межах. Ці процеси здійснюються переважно через реабсорбцію гідрокарбонатів, секрецію іонів гідрогену (ацидогенез) та утворення аміаку (аміногенез) [3]. Як діє ГХН на підтримання кислотно-основної рівноваги крові, на сьогодні не відомо. Ми можемо тільки припустити, що такий вплив існує, адже ГХН є джерелом іонів Na^+ , які впливають на цю систему.

ВИСНОВКИ

1. Дія гіпохлориту натрію призводить до оксидативного стресу в нирках.
2. За впливу гіпохлориту натрію відбувається порушення узгодженої діяльності ферментів антиоксидантної системи нирок.
3. Гіпохлориту натрію концентрацією 5 мг/л спричинює значнішу інтенсифікацію процесів первинного окиснення ліпідів упродовж 20 діб, ніж у концентрації 10 мг/л.

1. *Василенко Є.О., Раєцька Я.Б., Степанов Ю.В.* та ін. Вплив кверцетину на стан антиоксидантної системи і процесів ПОЛ при експериментальній моделі геморагічного інсульту у щурів. **Фізика живого**, 2008; 16(1): 116–119.
2. *Величенко А.Б., Лукьяненко Т.В., Плаксиенко И.Л.* и др. Химический состав и стабильность растворов гипохлорита натрия медицинского назначения. **Вопросы химии и химической технологии**, 2006; 6: 156–160.
3. *Демидова М.А.* **Наглядная фармакология**. Москва: GEOTAR-MED, 2001. 104 с.
4. *Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г.* Метод определения активности каталазы. **Лабораторное дело**, 1988; 1: 16–19.
5. *Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.М.* Простой и чувствительной метод определения СОД, основанный на реакции окисления кверцетина. **Вопросы медицинской химии**, 1990; 36(2): 88–91.
6. *Коцюмбас І.Я.* **Т-2 токсикоз птиці: Методичні рекомендації**. Київ: Тріада плюс, 2004. 13 с.
7. *Коцюмбас І.Я., Величенко О.Б., Коцюмбас Г.І.* та ін. **Перспективи застосування гіпохлоритів у ветеринарній медицині**. Львів: „Афіша”, 2009. 312 с.
8. *Мацьопа І.В., Григор'єва Н.П., Мещишен І.Ф.* Адаптація антиоксидантної системи нирок щурів до різних світлових режимів за інтоксикації тетрахлорметаном та дії мелатоніну. **Український біохімічний журнал**, 2010; 82(2): 75–84.
9. *Меньщикова Е.Б.* **Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты**. Москва: Слово, 2006. 556 с.
10. *Моин В.М.* Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах. **Лабораторное дело**, 1986; 2: 724–727.
11. *Нестерова Л.А., Смурова Е.А., Манухин Б.Н.* Характеристика связывания специфического блокатора [³H]-хинуклидинилбензилата М-холинорецепторами мембран коры мозга крыс. **Доклады Академии Наук**, 1995; 343 (2): 268–271.
12. *Сибірна Н.О., Масєвська О.М., Барська М.Л.* **Дослідження окремих біохімічних показників за умов оксидативного стресу**: Навчально-методичний посібник. Львів: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2006. 58 с.
13. *Тимирбулатов Р.Р., Селезнев Е.И.* Метод повышения интенсивности свободнорадикального окисления липидосодержащих компонентов крови и его диагностическое значение. **Лабораторное дело**, 1981; 4: 209–211.
14. *Торгалло Є.О., Раєцька Я.Б., Богданова О.В.* та ін. Особливості процесів вільнорадикального окиснення ліпідів за умов експериментального геморагічного інсульту, а також вивчення дії антиоксидантних препаратів. **Фізика живого**, 2009; 17(1): 155–158.
15. *Lowry O.H.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, 1951; 193(1): 404–415.

CHANGE IN LIPID PEROXIDATION INTENSITY AND ACTIVITY OF ENZYMES OF ANTIOXIDANT DEFENCE SYSTEM IN TISSUE OF THE BIRD'S KIDNEY UNDER THE EFFECT OF SODIUM HYPOCHLORITE OF DIFFERENT CONCENTRATIONS**N. P. Holovchak¹, H. I. Kotsyumbas², M. B. Galan¹, M. Y. Boyko¹, D. I. Sanahurskyi¹**¹*Ivan Franko National University of Lviv, 4, Hrushevskiy St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: golovchak_nataly@ukr.net*²*S. Z. Gzhytskyj Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies
50, Pekarska St., Lviv 79010, Ukraine*

Strengthening of the intensity of lipid peroxidation processes even after rehabilitation period (on 20 day of experiment), was observed under the effect of sodium hypochlorite in the concentration 5 mg/l. At the same time the activity of enzymes of the antioxidant system was not changed. Sodium hypochlorite in concentration 10 mg/l resulted in the increase of lipid peroxidation processes on the 7th time of experiment with the next lowering of the content of TBA-active products in relation to the effect on the 7th day of action of sodium hypochlorite. However, the activity of enzymes of the antioxidant system was increased at all variants of the experiment.

Key words: lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, glutathionperoxydase, sodium hypochlorite, kidney.

ИЗМЕНЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ЛИПОПЕРОКСИДАЦИИ И АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ СИСТЕМЫ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ В ТКАНЯХ ПОЧЕК ПТИЦЫ ПРИ ДЕЙСТВИИ ГИПОХЛОРИТА НАТРИЯ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ**Н. П. Головчак¹, Г. И. Коцюмбас², М. Б. Галан¹, М. Я. Бойко¹, Д. И. Санагурский¹**¹*Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина
e-mail: golovchak_nataly@ukr.net*²*Львовский национальный университет ветеринарной медицины и биотехнологии
имени С. З. Гжицкого
ул. Пекарская, 50, Львов 79010, Украина*

При действии гипохлорита натрия (ГХН) в концентрации 5 мг/л происходит усиление интенсивности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) даже после реабилитационного периода (на 20-е сутки исследования), тогда как действие ферментов антиоксидантной системы (АОС) становится несогласованным. ГХН в концентрации 10 мг/л ведёт к возрастанию процессов липопероксидации на 7-е сутки исследования с последующим понижением количества ТБК-активных продуктов относительно седьмых суток действия ГХН. Однако активность ферментов АОС возрастает на протяжении всего исследования.

Ключевые слова: перекисное окисление липидов, супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, гипохлорит натрия, почки.

Одержано: 17.02.2011