

ВЛИЯНИЕ ЭЛЕМЕНТОВ, СОДЕРЖАЩИХСЯ В МЕДНО-ЦИНКОВОЙ КОЛЧЕДАНОЙ РУДЕ, НА АНТИОКСИДАНТНУЮ СИСТЕМУ ПЕЧЕНИ

Давлетгареева Г.Р., Фаршатова Е.Р., Камиллов Ф.Х.

ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Уфа, e-mail: farshatova-ekaterina@rambler.ru

При длительном внутрижелудочном введении суспензии порошка медно-цинковой колчеданной руды половозрелым белым крысам изучены изменения содержания основных компонентов неферментативного (глутатион восстановленный, свободных сульфгидрильных группы белков, α -токоферол, аскорбиновая кислота) и ферментативного звена (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза) антиоксидантной защиты в печени. Установлена динамика изменений этих показателей через 1,2 и 3 месяца, указывающая на истощение физиологических механизмов антиоксидантной системы. Содержание восстановленного глутатиона к концу 3-го месяца снижается до 67,3 %, свободных тиоловых групп белков до 71,5 %, витаминов Е и С до 88,4 % и 82,2 % соответственно. Также значительно снижается активность ферментативного звена: супероксиддисмутаза до 74,5 %, глутатионпероксидаза до 67,5 % и каталазы до 80,7 %. Результаты исследования указывают на значимость изменений антиоксидантной системы тканей в механизмах токсического влияния элементов, содержащихся в рудах цветных металлов, и ведущее положение системы глутатиона в стабилизации окислительного гомеостаза клеток при их действии.

Ключевые слова: элементы медно-цинковой колчеданной руды, печень, глутатион восстановленный, свободные сульфгидрильные группы, α -токоферол, аскорбат, супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза.

IMPACT OF ELEMENTS CONTAINED IN THE COOPER-ZINC-PYRITE ORE ON LIVER ANTIOXIDANT SYSTEM

Davletgareeva G.R., Farshatova E.R., Kamilov F.H.

"Bashkir State Medical University" Ministry of Health, Russian Federation, Ufa, e-mail: farshatova-ekaterina@rambler.ru

With long-term intragastric administration of a suspension of a powder of copper-zinc-pyrite ore sexually mature white rats were studied by changing the content of the main components of non-enzymatic (glutathione reduced, free sulfhydryl groups of proteins, α -tocopherol, ascorbic acid) and enzymatic unit (superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase), antioxidant defense in the liver. The dynamics of changes of these indicators by 1.2 and 3 months, indicating depletion of the physiological mechanisms of antioxidant system. The content of reduced glutathione by the end of the 3rd month decreased to 67.3 %, the free thiol groups of proteins up to 71.5 %, vitamins E and C to 88.4% and 82.2 %, respectively. Also significantly reduced the activity of enzymatic chain: superoxide dismutase to 74.5 %, and 67.5 % of glutathione peroxidase and catalase to 80.7 %. The study results indicate the importance of changes in antioxidant system tissue mechanisms toxic effects of elements contained in ores of non-ferrous metals, and a leading position in the glutathione system oxidative homeostasis stabilizing cells in their action.

Keywords: elements of copper-zinc ore pyrite, liver, reduced glutathione, free sulfhydryl groups, α -tocopherol, ascorbate, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase.

Металлы, обладая стабильностью, высокой миграционной активностью, склонностью к биоаккумуляции, наличию специфических токсических эффектов представляют опасность для здоровья [11, 14]. Потенциальному риску хронического воздействия группы тяжелых металлов подвержены работники предприятий горнорудной промышленности. Выраженное увеличение содержания ряда элементов (Cu, Zn, Cr, Pb, Hg, Cd, As) в волосах горняков, добывающих медно-цинковую колчеданную руду, демонстрирует их поступление и накопление в организме [1, 5, 16]. При изучении профессиональной и производственно

обусловленной заболеваемости горнорабочих на предприятиях по добыче и обогащению цветных металлов установлено значительное распространение болезней органов пищеварения, а уровень заболеваемости коррелировал со стажем работы [1,2,12,13]. Исследования с моделированием интоксикации компонентами медно-цинковой колчеданной руды показали увеличение уровня биохимических маркеров функции печени в плазме крови, многократное повышение концентрации Zn, Cu, Cd и Pb в ткани органа [3, 5]. В механизмах токсического действия группы тяжелых металлов особое значение придается изменениям оксидантно-антиоксидного статуса тканей с развитием окислительного стресса [3,11,14].

Цель исследования: оценить уровень компонентов антиокислительной защиты печени экспериментальных животных при подострой интоксикации элементами, содержащимися в медно-цинковой колчеданной руде.

Материалы и методы. Опыт проведен на 70 самцах половозрелых белых крыс массой 200–240 г. Для моделирования подострой интоксикации элементами медно-цинковой колчеданной руды (Учалинское месторождение, Республика Башкортостан) животным в течение 3-х месяцев ежедневно внутрижелудочно вводили с помощью металлического зонда суспензию измельченного порошка руды в 2 % растворе крахмала из расчёта 60 мг/100 г массы. При расчёте вводимой дозы исходили из минимальной токсичной дозы меди [14] и среднего её содержания в руде 3,5 %. Крысы контрольной группы ежедневно получали 2 % раствор крахмала. Животные содержались в одинаковых условиях вивария на стандартном питании. Эксперименты проводили в соответствии с этическими нормами и рекомендациями о гуманном отношении к лабораторным животным, изложенными в «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных целях» и в соответствии с требованиями приказа Минздрава РФ № 267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики».

Животных выводили из эксперимента под лёгким эфирным наркозом через 1, 2 и 3 месяца. В гомогенатах печени исследовали содержание глутатиона восстановленного (ГВ) по [6], свободных сульфгидрильных групп белков (ССГ) по [17], α -токоферола [19], аскорбиновой кислоты [21], общую антиокислительную активность (ОАА) по [7], активности супероксиддисмутазы (СОД) и глутатионпероксидазы (ГПО) с использованием наборов реагентов фирмы «RandoxLaborLtd.», каталазы [8] и содержание белка по Лоури.

Результаты и обсуждение. Из приведённых в таблице данных следует, что длительное поступление компонентов медно-цинковой колчеданной руды вызывает в печени экспериментальных животных снижение уровня компонентов неферментативного звена и активности основных ферментов антиоксидантной защиты. Содержание глутатиона восстановленного к концу третьего месяца эксперимента уменьшается до 67,3 %, свободных

тиоловых групп белков – до 71,5 % от уровня контроля. Концентрации витамина Е и витамин С в печени снижается более умеренно-соответственно до 88,4 % и 82,2 %.

Показатели антиоксидантной защиты печени крыс при интоксикации элементами медно-цинковой колчеданной руды

Показатели	Контрольная группа n=10	Опытная группа		
		1 месяц	2 месяца	3 месяца
ГВ, мкмоль/мг белка	10,75 [7,79-13,18]	10,65 [8,10-13,15] P=0,8445	7,80 [6,05-11,16] P=0,0604	7,30 [5,71-9,14] P=0,0409
ССГ белков, мкмоль/мг	16,5 [13,4-19,3]	15,3 [12,8-17,6] P=0,5822	14,5 [12,6-15,3] P=0,1605	11,80 [10,2-14,6] P=0,0379
α – Токоферол, мкг/мг белка	5,69 [4,95-6,36]	4,91 [4,44-5,62] P=0,0343	4,90 [4,26-5,72] P=0,0365	5,03 [4,21-5,37] P=0,0378
Аскорбиновая кислота, мкг/мг белка	12,4 [10,9-13,8]	12,7 [10,2-13,7] P=0,7082	11,5 [10,6-12,3] P=0,3599	10,2 [9,9-11,8] P=0,0281
СОД, Ед/мг белка	10,2 [7,2-11,4]	8,4 [7,6-10,5] P=0,0435	7,4 [6,3-8,8] P=0,0311	7,6 [6,4-8,2] P=0,0366
ГПО, нмоль/мин/мг белка	7,92 [6,64-9,74]	7,85 [6,15-8,40] P=0,8282	5,55 [4,4-5,93] P=0,0262	5,35 [4,33-5,75] P=0,0178
Каталаза, ммоль/мин/мг белка	8,3 [7,5-8,9]	7,5 [6,3-8,7] P=0,1532	7,9 [5,7-7,8] P=0,6161	6,7 [5,4-7,8] P=0,0192
ОАА, %	41,1 [36,2-48,4]	40,4 [30,8-45,6] P=0,7341	35,5 [30,1-41,9] P=0,0426	34,2 [26,5-38,3] P=0,0342

В то же время падение содержания α -токоферола обнаруживается уже через 1 месяц от начала эксперимента ($p=0,0343$), а ГВ, СТГ и аскорбата происходит более умеренно, постепенно достигая статистической значимости лишь к третьему месяцу. Аналогичная

динамика наблюдается и при измерении общей антиокислительной активности ткани печени. Согласно мнению авторов, предложивших данный метод [7], ОАА характеризует преимущественно состояние неферментативного звена антиоксидантной защиты.

При длительном поступлении в организм элементов, содержащихся в медно-цинковой колчеданной руде, в печени снижается и активность более мощного – ферментативного звена антиокислительной защиты. Активность СОД к завершению второго месяца интоксикации составляет 72,5 % от исходного уровня ($p=0,0311$) и остается сниженной до конца эксперимента ($p=0,0366$). Активность ГПО также существенно падает на второй месяц введения суспензии порошка руды (до 70,1 %, $p=0,0262$) и в последующем продолжает снижаться. Более стабильная динамика изменений выявляется при изучении активности каталазы, которая статически значимого снижения достигает лишь к концу третьего месяца эксперимента.

В руде Учалинского месторождения содержание меди составляет 3,5 %, цинка – 5 %, серы 15–45 %, мышьяка 0,1–3,0 %, сурьмы 0,01–0,5 %, свинца 0,1–0,3 %, бария 0,2–7 %, кадмия 0,06–0,12 %. Постоянными сопутствующими компонентами являются хром, железо, серебро, золото, марганец, ртуть и другие элементы [1,12].

При действии металлов, содержащихся в руде, установленное снижение антиокислительной защиты в печени может быть следствием разных механизмов их действия. Так, ионы многих металлов образуют комплексы с биомолекулами, содержащими тио-(HS-) и алкилтиогруппировки (RS-), разрывают дисульфидные связи (-S-S- связи), нарушая макромолекулярные структуры белков и их функциональную активность [11,13]. Кроме того, такие элементы как Fe, Cu, Pb, Cd, Hg, Mn, Ni, содержащиеся в руде, индуцируют процессы свободнорадикального окисления липидов и белков, инициируя образование активных форм кислорода, и таким образом стимулируют повышенное потребление антиоксидантов в тканях [4,10].

Система глутатиона является одной из ведущих в антиоксидантной защите тканей, особенно в печени, где происходит наиболее интенсивный синтез этого трипептида [10,14]. Функции ГВ разнообразны. Он поддерживает в восстановленном состоянии свободные тиоловые группы белков, действует как прямой антиоксидант, инактивируя активные формы кислорода (гидроксил радикал, синглетный кислород, супероксиданион), стабилизирует мембраны перемещением ацилпероксидов, поддерживает клеточный гомеостаз аскорбиновой кислоты и токоферолов, участвуя в их восстановлении, входит в структуру ряда ферментов антиоксидантной защиты [4, 10, 14]. С одной стороны, снижение уровня ГВ при действии металлов может быть результатом выраженной интенсификации его потребления, с другой, может стать причиной снижения активности глутатионзависимых

антиоксидантных ферментов – глутатион-пероксидазы, глутатионтрансферазы, липидпероксидглутатионпероксидазы.

Буферная ёмкость тиоловых соединений оказывает влияние на состояние неспецифической резистентности организма, процессы апоптоза и пролиферации, метаболизма клеток, функционирование внутриклеточных механизмов передачи регуляторных сигналов, группы факторов трансляции и их взаимодействия с регулярными боксами ДНК [22]. Выделено более 20 так называемых «редокс-чувствительных» транскрипционных факторов. Реагируя на колебания окислительно-восстановительного статуса, они способны изменять транскрипцию нескольких сотен генов, входящих в систему антиоксидант-респонсивного элемента (АРЭ), являющегося ключевым фактором в поддержании внутриклеточного гомеостаза при токсических и других воздействиях [18]. Выделяют при этом два основных механизма контроля активности факторов транскрипции: окисление серусодержащих цистеиновых и метиониновых остатков и взаимодействие с металлами переменной валентности, входящих в состав молекул таких редокс-сенсоров, как NF- κ B, AP-1, Nrf-2 [20]. Действие активных форм кислорода через активацию АРЭ регулирует экспрессию важнейших факторов антиокислительной защиты и биотрансформации: ГПО, глутатионредуктазы, глутатионтрансферазы, СОД, тиоредоксина, тиоредоксинредуктазы, гамма-глутамилцистеинлигазы, глюкуронидтрансферазы и др. [10,18]. АРЭ таким путем контролирует основные факторы синтеза глутатиона и поддержания его восстановленного состояния. Сохранение на уровне контроля в первый месяц воздействия элементов руды содержания ГВ, ССГ белков, активности ГПО и ОАА ткани печени животных опытной группы, вероятно, связано с механизмами активации АРЭ с напряжением систем биосинтеза и редукции глутатиона. Увеличение длительности поступления компонентов руды до трёх месяцев приводит к истощению механизмов поддержания и падению уровня ферментативных антиоксидантов и активности ферментов антиокислительной системы.

Активность и стабильность ключевых ферментов антиоксидантной защиты взаимосвязаны. СОД, каталаза и ГПО инактивируются одним из продуктов их ферментативной реакции, и согласованное действие этих ферментов является необходимым для эффективной защиты их от непосредственного инактивирующего действия образующихся активных форм кислорода [4]. При этом каталаза наиболее длительно сохраняет свою активность, фермент почти не требует энергии активации, и скорость его реакции лимитирует лишь скорость диффузии субстрата к активному центру [10].

ГВ тесно связан с обменом не только свободных тиоловых групп белков, но и с такими прямыми антиоксидантами, как токоферолы – главными перехватчиками радикалов в

липидной фазе биомембран и аскорбиновая кислота, обладающей широким спектром действия и функционирующей с глутатионом в цитозоле клеток [4,9]. Хотя крысы и синтезируют аскорбат из глюкуроновой кислоты, но восстановление дегидроаскорбатного радикала осуществляется за счет глутатионового цикла, а сама аскорбиновая кислота важна для регенерации окисленного α -токоферола [10, 14]. Однако в присутствии ионов переменной валентности, особенно железа и меди, аскорбат проявляет прооксидантные свойства, и при избыточном поступлении металлов в условиях недостаточной их секвестрации аскорбиновая кислота может усугублять развитие окислительного стресса [4,10]. Накопление металлов переменной валентности в тканях опасно ещё и тем, что в среде легкоокисляемых соединений происходит их восстановление, и они выступают в качестве прооксидантов.

Заключение

Полученные результаты указывают на патогенетическую значимость функционирования антиоксидантной защиты ткани печени в условиях длительного поступления в организм элементов медно-цинковой колчеданной руды, что характеризуется снижением концентрации восстановленного глутатиона, свободных сульфгидрильных групп белков, α -токоферола и аскорбиновой кислоты, падением активности ключевых антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза), приводящее к нарушению про- и антиоксидантного статуса и дезорганизации метаболизма. Более детальная характеристика системы глутатиона, занимающей ведущее положение в снижении и предотвращения токсического действия металлов, содержащихся в медно-цинковой колчеданной руде, требует дальнейшего целенаправленного изучения.

Список литературы

1. Аскарлова З.Ф., Чашин В.П., Денисов Э.И. Профессиональный риск у работников горнодобывающих предприятий. – СПб.: Норд – мездат, 2010. – 216 с.
2. Баттакова Ж.Е., Исламова А.А., Султанбекова З.К. и др. Оценка общей и профессиональной заболеваемости на предприятиях горнорудной промышленности // Медицина труда и пром. экология. – 2008. – № 2. – С.1-5.
3. Давлетгареева Г.Р., Фаршатова Е.Р. Влияние компонентов медно-цинковых колчеданных руд на содержание глутатиона восстановленного и тиольных групп протеинов печени // Вестник Башкирского государственного медицинского университета (сетевое издание). – 2016. – № 4. – С.146-150.
4. Дубинина Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности

клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клинко-биохимические аспекты. – СПб.: Изд-во «Медицинская пресса», 2006. – 400 с.

5. Камиллов Ф.Х., Фаршатов Е.Р., Меньшикова И.А., Бикметова Э.Р., Ганеев Т.И. Остеопороз: влияние химических факторов производственной среды на метаболизм костной ткани. – Уфа: Изд-во «ГУП РБ Уфимский полиграфкомбинат», 2015. – 311с.

6. Карпищенко А.И., Глушков С.И. Влияние острой интоксикации дихлорэтаном на показатели системы глутатиона // Клиническая лабораторная диагностика. – 1997. – № 6. – С. 52–56.

7. Клебанов Г.И., Бабенкова И.В., Теселкин Ю.О. и др. Оценка антиокислительной активности плазмы крови с применением желточных гликопротеинов // Вопр. мед. химии. – 1988. – Т.34, вып.6. – С.59-62.

8. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения каталазы //Лабораторное дело. – 1988. – № 1. – С.16–19.

9. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Система глутатиона. Синтез, транспорт глутатионтрансферазы, глутатионпероксидазы // Биомед. химия. – 2009. – Т.55, вып. 3. – С. 255-277.

10. Меньшикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. и др. Проксиданты и антиоксиданты. – М.: Фирма «Слово», 2006. – 556с.

11. Некоторые вопросы токсичности ионов металлов / под ред. Х. Зегель, А. Зегель. – М.: Мир, 1993. – 368с.

12. Профессиональная и производственно обусловленная заболеваемость у горнорабочих: особенности формирования и профилактика / под ред. З.С. Терегуловой, Л.К. Каримовой, А.Б. Бакирова. – Уфа: Мир печати, 2010. – 176с.

13. Сааркоппель Л.М. Сравнительная оценка состояния здоровья рабочих горнорудной промышленности // Медицина труда и пром. экология. – 2007. – № 12. – С.17–22.

14. Токсикологическая химия. Метаболизм и анализ токсикантов /под ред. проф. Н.И. Калетиной. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 1016с.

15. Толпыгина О.А. Роль глутатиона в системе антиоксидантной защиты (обзор) // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2012. – № 2(84), ч. 2. – С.178–180.

16. Чащин В.П., Аскарлова З.Ф., Ларионова Т.К., Кудашева А.Р. Элементный статус работников горно-обогатительного комбината // Медицина труда и пром. экология. – 2007. – № 10. – С.9–13.

17. Bellomo G., Thor H., Orrenius S. Modulation of cellular glutathione and proteinthiol status during acute methabolism // Methods in Enzymology. – 1990. – Vol.186. – P.627-635.

18. Cullinan S.B., Dichl I.A. Coordination of ER and oxidative stress signaling: the PERK/Nrf2 signaling pathway // *Int. J. Biochem Cell. Biol.* – 2006. – Vol. 38, № 3. – pp. 317– 332.
19. Dasai I.D. Vitamin E analysis methods for animals tissues // *Methods in Enzimology.* – 1984. – Vol.105. – pp. 138–147.
20. Hansen J.M., Watson W.H., Jones D.P. Compartmentation of Nrf – 2 redox control: regulation of cytoplasmic activation by glutathione and DNA binding by thioredoxin -1 // *Toxicol. Sci.* – 2004. – Vol. 82. – pp. 308–317.
21. Omaye S.T., Turnball J.W., Sauberlich H.E. Selected methods for the termination of ascorbic acid in animal cells, tissues and fluids// *Methods in Enzimology.* – 1971. – Vol.62. – pp.1–11.
22. Poole L.B., Kaplus P.A., Claiborne A. Protein sulfenic acids in redox signaling // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2004. – Vol.44. – pp. 325-374.