



# АНТИОКСИДАНТНА СИСТЕМА ЩУРІВ ЗА УМОВ ІНТОКСИКАЦІЇ ВАЖКИМИ МЕТАЛАМИ ТА ПРИ ЗАСТОСУВАННІ $\alpha$ -ЛІПОЄВОЇ І ФОЛІЄВОЇ КИСЛОТ

**І.В. Калінін, кандидат біол. наук, Н.М. Данченко, Б.О. Цудзевич, доктор біол. наук, проф.**  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна

**Резюме.** В роботі наведено дані експериментальних досліджень щодо функціонування антиоксидантної системи щурів за умов інтоксикації важкими металами (міді сульфату, цинку сульфату, кадмію сульфату і свинцю азотнокислого) та при застосуванні  $\alpha$ -ліпоєвої і фолієвої кислот. Показано, що застосування  $\alpha$ -ліпоєвої і фолієвої кислот сприяє встановленню балансу між про- і антиоксидантами та підтримує оптимальний метаболічний баланс у клітині.

**Ключові слова:** мідь, цинк, кадмій, свинець, кров, печінка, щури, антиоксидантна система,  $\alpha$ -ліпоєва кислота, фолієва кислота.

**Резюме.** В работе приведены данные экспериментальных исследований о функционировании антиоксидантной системы крыс при условии интоксикации тяжелыми металлами (меди сульфата, цинка сульфата, кадмия сульфата и свинца азотнокислого) и применении  $\alpha$ -липовоевой и фолиевой кислот. Показано, что применение  $\alpha$ -липовоевой и фолиевой кислот способствует восстановлению баланса между про- и антиоксидантами, а также поддерживает оптимальный метаболіческий баланс в клетке. **Ключевые слова:** медь, цинк, кадмий, свинец, кровь, печень, крысы, антиоксидантная система,  $\alpha$ -липовоевая кислота, фолиевая кислота.

**Summary.** The data of the experimental researches on the functioning of the antioxidant system in rats under the condition of intoxication by heavy metals (copper sulfate, zinc sulfate, cadmium sulfate and lead nitrate) and the use of  $\alpha$ -lipoic acid and folic acid are shown in this article. Use of  $\alpha$ -lipoic and folic acid helps to restore the balance between pro- and antioxidants, and maintains an optimal metabolism in the cell.

**Key words:** copper, zinc, cadmium, lead, blood, liver, rats, antioxidant system,  $\alpha$ -lipoic acid, folic acid.

Важкі метали викликають посилення вільнорадикального окиснення та призводять до розладу антиоксидантного захисту.  $\alpha$ -ліпоєва кислота ( $\alpha$ -ЛК) завдяки широкому спектру дії на всі ланки метаболізму використовується при багатьох патологічних станах, у тому числі й при захворюваннях печінки та різноманітних інтоксикаціях.

Завдяки своїм унікальним фізико-хімічним властивостям  $\alpha$ -ліпоєва кислота є реакційно здатною біологічною молекулою, яка була еволюційно створена для ряду біохімічних реакцій, необхідних для окисного метаболізму і модуляції функцій клітин [1–3].

Фолієва кислота, вітамін B<sub>9</sub> (ФК) виконує важливу роль у реакціях синтезу нуклеїнових кислот, білків, обміні фосфоліпідів, підвищує каталітичну активність мітосомальних монооксигеназ, позитивно впливає на функціональний стан печінки, стимулює жовчовиділення, зменшує жирову інфільтрацію печінки, викликану дефіцитом холіну в їжі. Наявність у птеринової частині молекули ФК гідроксильних груп і третинних атомів нітрогену дозволяє зв'язувати важкі метали [4, 5].

Метою роботи було дослідження функціонування антиоксидантної системи щурів за умов інтоксикації важкими металами (міді сульфату, цинку сульфату, кадмію сульфату і свинцю азотнокислого) та при застосуванні  $\alpha$ -ліпоєвої і фолієвої кислот.

## Матеріали і методи

Досліди проводили на білих нелінійних щурах-самцях, одного віку, масою 180–200 г., впродовж 14 діб. Було утворено п'ять груп тварин: перша — інтактні (контроль), друга — тваринам перорально вводили розчин міді сульфату в дозі 3 мг/кг, що становить 1/10 від ЛД<sub>50</sub>, третя — щурам перорально вводили розчин цинку сульфату в дозі 2 мг/кг, що становить 1/20 від ЛД<sub>50</sub>, четверта — тваринам перорально вводили розчин кадмію сульфату в дозі 1,5 мг/кг, що становить 1/30 від ЛД<sub>50</sub>, п'ята — тваринам перорально вводили розчин свинцю азотнокислого в дозі 1,7 мг/кг, що становить 1/50 від ЛД<sub>50</sub>. Після інтоксикації здійснювали введення ФК в дозі 0,1 мг/кг та  $\alpha$ -ЛК із розрахунку 100 мг/кг ваги один раз на добу впродовж 10 діб. Щурів декапітували під ефірним наркозом і

відбирали тканини крові та печінки для подальших досліджень. Вся робота проводилась відповідно до конвенції Ради Європи щодо захисту хребетних тварин, яких використовують у наукових цілях. Кров отримували загальновідомими методами, а препарати гомогенної фракції клітин печінки — методом диференційного центрифугування [6]. Вміст ТБК-активних продуктів визначали за [7], дієнових кон'югатів (ДК) за [8]. Визначали активність: супероксиддисмутази (СОД, КФ 1.15.1.1) за методом [9]; каталази (КАТ, КФ 1.11.1.9) за [10]; глутатіонпероксидази (ГП, КФ 1.11.1.9) та глутатіон-трансферази (ГТ, КФ 2.5.1.18) за [11–12]. Вміст відновленого глутатіону (GSH) визначали методом [13]. Експериментальні дані обробляли статистично з використанням t-критерію Стьюдента [14].

### Результати та обговорення

Результати досліджень антиоксидантної системи у тканинах інтоксикованих щурів після застосування  $\alpha$ -ліпоєвої і фолієвої кислот наведено в таблицях 1–3.

У крові та тканинах печінки щурів при інтоксикації іонами міді, цинку, кадмію і свинцю виявлено активацію пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), яке оцінювали по накопиченню ТБК-активних продуктів.

Інтоксикація міді сульфатом призводить до збільшення ТБК-активних продуктів на 40% у крові та на 31% у печінці; цинку сульфатом — на 42% в

крові та на 31% в печінці, кадмію сульфатом — на 66% в крові та на 38% в печінці; свинцем азотно-кислим — на 61% в крові та на 36% в печінці відносно контрольної групи тварин.

Після інтоксикації іонами важких металів збільшується вміст дієнових кон'югатів (ДК) (табл. 1) у крові та печінці щурів. Так, у крові вміст ДК збільшився на 16 % при інтоксикації міді сульфатом, на 18 % — цинку сульфатом, на 24 % — кадмію сульфатом, на 26 % — свинцем азотнокислим порівняно з контрольною групою.

Антиоксидантна система захисту організму контролює і гальмує всі етапи вільнорадикальних реакцій, починаючи від їхньої ініціації та закінчуючи утворенням гідроперекисів та МДА. Інтоксикація іонами важких металів призводить до зниження активності СОД і КАТ у досліджуваних тканинах щурів (табл. 2), особливо при інтоксикації іонами кадмію та свинцю.

Ймовірно таке зниження можна пояснити ушкодженням молекули ферменту, а також підвищенням концентрації гідроген пероксиду внаслідок активації окисних процесів і порушенням реакцій окисно-фосфорилування та інших метаболічних процесів. У деяких випадках для реалізації активності СОД і КАТ важливим фактором є наявність мікроелементів, а порушення гомеостазу міді та цинку, внаслідок токсичної дії, створює умови для патологічних процесів.

Таблиця 1

### Вміст ТБК-активних продуктів і дієнових кон'югатів у крові та печінці щурів за умов інтоксикації важкими металами та при застосуванні $\alpha$ -ліпоєвої і фолієвої кислот ( $M \pm m$ , $n=8$ )

Групи тварин	ТБК-активні продукти		Дієнові кон'югати	
	Кров	Печінка	Кров	Печінка
	ммоль/л	мкмоль/мг білка	(E233/E218)	
Контроль	1,34±0,05	0,74±0,03	0,84±0,04	0,97±0,05
Інтокс. CuSO <sub>4</sub>	1,87±0,09*	0,97±0,04*	0,98±0,07	1,02±0,09
Інтокс. ZnSO <sub>4</sub>	1,91±0,04*	0,95±0,05*	0,99±0,05	1,04±0,07
Інтокс. CdSO <sub>4</sub>	2,23±0,08*	1,02±0,07*	1,04±0,06*	1,10±0,08*
Інтокс. Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	2,16±0,05*	1,01±0,05*	1,06±0,09*	1,08±0,04*
Після застосування $\alpha$ -ЛК				
CuSO <sub>4</sub> + $\alpha$ -ЛК	1,42±0,09**	0,75±0,02**	0,88±0,05	0,98±0,07
ZnSO <sub>4</sub> + $\alpha$ -ЛК	1,49±0,04**	0,74±0,04**	0,89±0,03	0,99±0,05
CdSO <sub>4</sub> + $\alpha$ -ЛК	1,63±0,08**	0,75±0,02**	0,91±0,04	1,01±0,06
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> + $\alpha$ -ЛК	1,68±0,05**	0,76±0,04**	0,95±0,07	0,99±0,04
Після застосування ФК				
CuSO <sub>4</sub> + ФК	1,54±0,11**	0,76±0,03**	0,93±0,06	1,01±0,08
ZnSO <sub>4</sub> + ФК	1,61±0,05	0,75±0,02**	0,94±0,04	1,02±0,06
CdSO <sub>4</sub> + ФК	2,01±0,07	0,77±0,03**	0,99±0,05	1,06±0,07
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> + ФК	1,94±0,06	0,79±0,04**	1,01±0,08	1,03±0,05

Примітка: тут і далі в таблицях \*  $p \leq 0,05$  порівняно з контролем;

\*\* —  $P \leq 0,05$  — порівняно з інтоксикованими.

Таблиця 2

**Активність супероксиддисмутази (СОД) та каталази (КАТ) у крові та печінці щурів за дії іонів важких металів та при застосуванні  $\alpha$ -ЛК і ФК ( $M \pm m$ ,  $n=8$ )**

Групи тварин	Кров		Печінка	
	СОД (ум.од)	КАТ (мкмоль/л $\cdot$ хв)	СОД (ум.од)	КАТ (мкмоль/л $\cdot$ хв)
Контроль	0,83 $\pm$ 0,05	11,2 $\pm$ 1,1	2,83 $\pm$ 0,32	0,18 $\pm$ 0,03
Інттокс. CuSO <sub>4</sub>	0,68 $\pm$ 0,02	10,1 $\pm$ 0,9	2,68 $\pm$ 0,17	0,12 $\pm$ 0,02*
Інттокс. ZnSO <sub>4</sub>	0,70 $\pm$ 0,04	10,7 $\pm$ 0,7	2,71 $\pm$ 0,15	0,14 $\pm$ 0,03*
Інттокс. CdSO <sub>4</sub>	0,60 $\pm$ 0,03*	8,5 $\pm$ 0,9*	1,37 $\pm$ 0,14*	0,09 $\pm$ 0,01*
Інттокс. Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,62 $\pm$ 0,05*	8,9 $\pm$ 0,8*	1,72 $\pm$ 0,19*	0,11 $\pm$ 0,01*
Після застосування $\alpha$ -ЛК				
CuSO <sub>4</sub> + $\alpha$ -ЛК	0,78 $\pm$ 0,04	10,8 $\pm$ 1,1	2,76 $\pm$ 0,17	0,15 $\pm$ 0,02**
ZnSO <sub>4</sub> + $\alpha$ -ЛК	0,80 $\pm$ 0,06	11,1 $\pm$ 1,2	2,79 $\pm$ 0,19	0,17 $\pm$ 0,05**
CdSO <sub>4</sub> + $\alpha$ -ЛК	0,72 $\pm$ 0,07	10,7 $\pm$ 1,1**	2,12 $\pm$ 0,21**	0,16 $\pm$ 0,04**
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> + $\alpha$ -ЛК	0,74 $\pm$ 0,08	10,4 $\pm$ 0,9**	1,94 $\pm$ 0,37	0,16 $\pm$ 0,05**
Після застосування ФК				
CuSO <sub>4</sub> + ФК	0,71 $\pm$ 0,03	10,5 $\pm$ 0,9	2,70 $\pm$ 0,12	0,13 $\pm$ 0,01
ZnSO <sub>4</sub> + ФК	0,74 $\pm$ 0,05	10,9 $\pm$ 1,1	2,73 $\pm$ 0,17	0,15 $\pm$ 0,04
CdSO <sub>4</sub> + ФК	0,66 $\pm$ 0,05**	9,7 $\pm$ 0,9**	1,81 $\pm$ 0,10**	0,12 $\pm$ 0,02**
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> + ФК	0,68 $\pm$ 0,07**	9,5 $\pm$ 0,8**	1,79 $\pm$ 0,21	0,14 $\pm$ 0,03**

Таблиця 3

**Активність глутатіонпероксидази (ГП) і глутатіонтрансферази (ГТ) та вміст відновленого глутатіону (GSH) в крові та печінці щурів за дії іонів важких металів та при застосуванні  $\alpha$ -ЛК і ФК ( $M \pm m$ ,  $n=8$ )**

Групи тварин	Кров			Печінка		
	ГП (ммоль/хв $\cdot$ л)	ГТ (ммоль/хв $\cdot$ л)	GSH (ммоль/л)	ГП (ммоль/хв $\cdot$ л)	ГТ (ммоль/хв $\cdot$ л)	GSH (ммоль/л)
Контроль	0,27 $\pm$ 0,12	68,01 $\pm$ 4,71	0,38 $\pm$ 0,04	0,37 $\pm$ 0,02	0,48 $\pm$ 0,05	0,80 $\pm$ 0,04
Інттокс. CuSO <sub>4</sub>	0,21 $\pm$ 0,11*	35,72 $\pm$ 3,68*	0,29 $\pm$ 0,03*	0,34 $\pm$ 0,03	0,46 $\pm$ 0,07	0,67 $\pm$ 0,05
Інттокс. ZnSO <sub>4</sub>	0,21 $\pm$ 0,14*	34,10 $\pm$ 3,52*	0,28 $\pm$ 0,07*	0,36 $\pm$ 0,05	0,44 $\pm$ 0,03	0,62 $\pm$ 0,07
Інттокс. CdSO <sub>4</sub>	0,17 $\pm$ 0,09*	27,42 $\pm$ 2,90*	0,25 $\pm$ 0,02*	0,28 $\pm$ 0,04*	0,39 $\pm$ 0,02*	0,31 $\pm$ 0,03*
Інттокс. Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,18 $\pm$ 0,10*	29,71 $\pm$ 3,10*	0,26 $\pm$ 0,05*	0,30 $\pm$ 0,03*	0,41 $\pm$ 0,04*	0,39 $\pm$ 0,05*
Після застосування $\alpha$ -ЛК						
CuSO <sub>4</sub> + $\alpha$ -ЛК	0,26 $\pm$ 0,05**	51,73 $\pm$ 4,12**	0,37 $\pm$ 0,05**	0,36 $\pm$ 0,04	0,48 $\pm$ 0,03	0,72 $\pm$ 0,07
ZnSO <sub>4</sub> + $\alpha$ -ЛК	0,25 $\pm$ 0,04	54,35 $\pm$ 3,24**	0,35 $\pm$ 0,04**	0,36 $\pm$ 0,03	0,47 $\pm$ 0,05	0,70 $\pm$ 0,06
CdSO <sub>4</sub> + $\alpha$ -ЛК	0,26 $\pm$ 0,08**	44,37 $\pm$ 2,83**	0,32 $\pm$ 0,03**	0,35 $\pm$ 0,04**	0,44 $\pm$ 0,05	0,51 $\pm$ 0,07**
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> + $\alpha$ -ЛК	0,24 $\pm$ 0,05	42,53 $\pm$ 2,71**	0,33 $\pm$ 0,03**	0,36 $\pm$ 0,03	0,46 $\pm$ 0,07	0,58 $\pm$ 0,08**
Після застосування ФК						
CuSO <sub>4</sub> + ФК	0,24 $\pm$ 0,14	46,82 $\pm$ 4,12**	0,33 $\pm$ 0,05	0,35 $\pm$ 0,04	0,47 $\pm$ 0,03	0,69 $\pm$ 0,07
ZnSO <sub>4</sub> + ФК	0,23 $\pm$ 0,11	45,21 $\pm$ 3,42**	0,31 $\pm$ 0,04*	0,35 $\pm$ 0,02	0,46 $\pm$ 0,04	0,68 $\pm$ 0,05
CdSO <sub>4</sub> + ФК	0,23 $\pm$ 0,07**	38,24 $\pm$ 2,71**	0,29 $\pm$ 0,01	0,32 $\pm$ 0,03	0,41 $\pm$ 0,03	0,46 $\pm$ 0,01**
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> + ФК	0,20 $\pm$ 0,02	32,49 $\pm$ 2,43	0,30 $\pm$ 0,04	0,33 $\pm$ 0,02	0,44 $\pm$ 0,05	0,51 $\pm$ 0,06**

У крові щурів (табл. 3) за умов інтоксикації міді сульфатом зменшується: активність ГП на 22 %, ГТ на 47 % і вміст відновленого глутатіону на 23 %; цинку сульфату — активність ГП на 23 %, ГТ на 50 % і GSH на 27 %; кадмію сульфату — ГП на 38 %, ГТ на 60 % і GSH на 34 %; свинцю азотнокислого — ГП на 34 %, ГТ на 57 % і GSH на 31 % відповідно, у

порівнянні з контрольною групою тварин.

За умов інтоксикації міддю сірчаноокислюю і цинку сульфатом активність ГП і ГТ у печінці щурів змінюється незначно. Активність у печінці ГП і ГТ за умов дії іонів кадмію зменшується на 25 % і 19 % відповідно, порівняно з контролем. При дії іонів свинцю активність ГП і ГТ у печінці щурів зменши-

лась на 19 % і 15 % відповідно, у порівнянні з контрольними тваринами.

Слід відзначити, що більш інтенсивно зменшувався вміст відновленого глутатіону в печінці інтоксикованих щурів:  $\text{CuSO}_4$  — на 17 %,  $\text{ZnSO}_4$  — на 23 %,  $\text{CdSO}_4$  — на 61 %,  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  — на 51 %, відносно контрольної групи тварин. Таку зміну, на наш погляд, можна пояснити тим, що глутатіон бере участь у захисних реакціях клітинних органел.

Таким чином, аналіз одержаних результатів вказує на порушення проокисно-антиоксидантної рівноваги. Слід відзначити, що саме глутатіонпероксидазна система, є універсальною при розкладі пероксидів і перешкоджає ініціації вторинних реакцій окиснення ліпідів та бере участь у інактивації продуктів окисного метаболізму ксенобіотиків.

Введення щурам  $\alpha$ -ліпоєвої кислоти сприяло збільшенню вмісту GSH та активності досліджуваних ферментів у печінці порівняно з інтоксикованими тваринами, які не отримували вказаний препарат.

Призначення щурам фолієвої кислоти послаблює негативний вплив важких металів на організм щурів і позитивно впливає на показники АОС.

Отже,  $\alpha$ -ЛК є метаболічним стимулятором і антиоксидантом, володіє широким спектром позитивних ефектів на хімічні та фізичні агенти, які призводять до метаболічних порушень.

Застосування ФК проявляє антиоксидантний ефект, що необхідно враховувати в комплексному захисті живого організму від токсичних впливів важких металів.

### Висновок

Застосування фолієвої і  $\alpha$ -ліпоєвої кислот сприяє підвищенню активності супероксиддисмутази, каталази, глутатіонпероксидази, глутатіонтрансферази і відновленого глутатіону у тканинах інтоксикованих щурів, що сприяє встановленню балансу між про- і антиоксидантами та підтримує оптимальний метаболічний баланс у клітині.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Трахтенберг И.М. Современные аспекты применения  $\alpha$ -липовой кислоты при экзогенных токсических воздействиях (обзор литературы) / И.М. Трахтенберг, О.В. Ермакова, И.П. Лубянова // Совр. пробл. токсикол. –2005. –№ 3. –С. 27–31.
2. Biewenga G.P. The pharmacology of the antioxidant lipoic acid / G.P. Biewenga, G.R. Haenen, A. Bast // Gen Pharmacol. –1997. –Vol. 29, № 3. –P. 315.
3. (R)- $\alpha$ -lipoic acid-supplemented old rats have improved mitochondrial function, decreased oxidative damage, and increased metabolic rate / T.M. Hagen, R.T. Ingersoll, J. Lykkesfeldt [et al.] // FASEB J. –1999. –Vol. 13, № 2. — P. 411–418.
4. Shooshtari M.K. Memory and motor coordination improvement by folic Acid supplementation in healthy adult male rats / M.K. Shooshtari, A.A. Moazedi, G.A. Parham // Iran J. Basic Med. Sci. –2012. –Nov. 15(6). –P. 1173–1179.
5. The Effect of Folate Supplementation on Methotrexate Efficacy and Toxicity in Psoriasis Patients and Folic Acid Use by Dermatologists in the USA / A. Al-Dabagh, S.A. Davis, M.A. Kinney [et al.] // Am. J. Clin. Dermatol. –2013.–Jun. 14(3). — P. 155–161.
6. Практикум по биохимии: учебное пособие / [под ред. С.Е.Северина, Г.А. Соловьевой] –М.: Из-во МГУ, 1989. –509 с.
7. Современные методы в биохимии / И.Д. Стальная, Т.Г. Гаришвили [под ред. В.Н. Ореховича] –М. Медицина, 1977. –С. 66–68.
8. Гаврилов В.Б. Измерение диеновых конъюгатов в плазме крови по УФ-поглощению гептановых и изопропанольных экстрактов / В.Б. Гаврилов, А.Р. Гаврилова, Н.Ф. Хмара // Лабораторное дело. –1988. –№ 2. –С. 60–63.
9. Орехович В.Н. Современные методы в биохимии / В.Н. Орехович. –М.: Медицина, 1977. –268 с.
10. Королюк М.А. Метод определения активности каталазы в биологическом материале / М.А. Королюк // Лабораторное дело. –1988. –№2. –С. 31–34.
11. Mannervik V. Glutathione peroxidase / V. Mannervik // Methods in enzymology. Acad. Press. –1985. –Vol. 113. –P. 490–495.
12. Власова С.Н. Активность глутатионзависимых ферментов эритроцитов при хронических заболеваниях печени у детей / С.Н. Власова, Е.И. Шабунина, А.И. Переслегина // Лаб. дело. –1990. –№ 8. –С. 19–21.
13. Ellman G.L. Tissue sulfhydryl groups / G.L. Ellman // Arch. Biochem. Biophys. –1959. –V. 82, N1. –P. 70–77.
14. Кучеренко М.Є. Сучасні методи біохімічних досліджень / М.Є. Кучеренко, Ю.Д. Бабенюк, В.М. Войціцький. –К.: Фітосоціоцентр, 2001. –С. 109–152.

Надійшла до редакції 05.06.2013 р.