

## **Роль окислительного стресса в механизме токсического действия фунгицидной композиции на основе солей меди и цинка**

Общим характером токсического действия фунгицидной композиции на основе солей меди и цинка является дисфункция антиоксидантной системы, сопровождаемая нарушением ферментной организации клетки и целостности мембранных структур. В основе этих изменений лежит способность компонентов фунгицидной композиции, в первую очередь соединений меди, инициировать свободно-радикальные процессы.

Ключевые слова: окислительный стресс, медь, цинк.

S.V. Tkachev

The role of the oxidative stress in mechanism of toxic action of fungicide composition on the basis of copper and zinc salts

Dysfunction of antioxidant system is the general character of toxic action of fungicide composition on the basis of copper and zinc salts. Dysfunction of antioxidant system is accompanied by violation of enzyme organization cell and the condition of being of membrane structures. The foundation of these changes show the ability of fungicide composition components to initiate free-radical processes especially copper compounds first.

Key words: oxidative stress, copper, zinc

Среди химических веществ, загрязняющих различные объекты внешней среды, тяжелые металлы образуют значительную группу токсикантов, во многом определяющую антропогенное воздействие на человека и окружающую среду. Учитывая все возрастающие масштабы производства и применения металлосодержащих ксенобиотиков, их высокую токсичность, способность накапливаться в организме человека, оказывать вредное влияние даже в сравнительно низких концентрациях, данные химические загрязнители должны быть отнесены к числу приоритетных [2]. В тоже время, трудности оценки степени риска для человека и биосферы в целом, обусловленного воздействием тяжелых металлов, связаны с возможностью их комбинированного влияния на организм человека.

Цель исследования – изучить способность фунгицидной композиции на основании солей меди и цинка (ФКМЦ) индуцировать свободно-радикальные процессы, приводящие к нарушению сбалансированности прооксидантной и антиоксидантной систем и формированию окислительного стресса (ОС).

Известно, что ОС выступает в качестве основного механизма токсического действия меди [5]. В противоположность этому, цинк хорошо известен своими антиоксидантными свойствами, которые реализуются через индукцию металлотионеинов и защиту белковых сульфгидрильных групп от редокс активных переходных металлов (железо, медь) [7]. Этот биохимический антагонизм, возможно, создает определенные особенности токсического эффекта при действии ксенобиотиков содержащих соли меди и цинка.

Материалы и методы

Объектом исследований служила водная суспензия ФКМЦ, полученная из металлосодержащих промышленных отходов и используемая в качестве фунгицида. Содержание тяжелых металлов в композиции определяли атомно-абсорбционным методом. Исследования выполнены на атомно-абсорбционном спектрофотометре AAS Vario 6 («Analytik Jena AG», Германия). Установлено, что ФКМЦ содержит (г/л): Cu – 83,25; Zn – 0,11; Cd – 0,002; Pb – не обнаружен.

Оценку способности ФКМЦ индуцировать ОС и вызывать мембранотропные эффекты проводили на 40 беспородных белых крысах, в условиях субхронического (30 и 60 суток) внутрижелудочного введения ФКМЦ в дозе, составляющей 1/10 от максимально возможной (15000 мг/кг), установленной в остром опыте. Контрольная группа животных в аналогичных условиях получала в эквивалентном объеме воду. Развитие ОС оценивали по уровню накопления малонового диальдегида (МДА) и карбонильных производных аминокислотных остатков белков (КПА) в сыворотке крови и гомогенате печени. Содержание МДА определяли по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой, в качестве стандарта использовали 1, 1, 3, 3 – тетраметоксипропан («Sigma», США). Содержание КПА определяли по методу Левина в модификации Е.Е.Дубининой, основанном на реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков с 2,4-динитрофенилгидразином, приводящей к образованию динитрофенилгидразонов, регистрируемых при длине волны 370 нм. Окислительную модификацию белков сыворотки крови также регистрировали по накоплению битирозина и снижению флуоресценции остатков триптофана. Битирозиновую флуоресценцию измеряли при  $\lambda_{\text{возб}} = 325$  нм и  $\lambda_{\text{исп}} = 416$  нм, триптофановую флуоресценцию регистрировали при  $\lambda_{\text{возб}} = 297$  нм и  $\lambda_{\text{исп}} = 336$  нм. Измерение всех видов флуоресценции проводили в 1/15М фосфатном буфере (рН – 7,4), на спектрофлуориметре СФЛ1211А («Солар», Беларусь).

Состояние АОС в эритроцитах и гомогенатах печени оценивали по содержанию глутатиона восстановленного (ГВ), а также активности глутатионредуктазы (ГР), глюкозо-6-фосфотдегидрогеназы (Г-6-ФДГ) и супероксиддисмутазы (СОД). Уровень ГВ определяли по реакции с аллоксаном. Общую активность ГР изучали методом I. Garlberg. Определение активности Г-6-ФДГ проводили по Разумовской Н.И. Активность СОД определяли по степени торможения реакции окисления кверцетина. Антиоксидантный потенциал сыворотки крови оценивали по содержанию церулоплазмينا (ЦП). Измерения проводили модифицированным методом Равина.

Для изучения состояния внутриклеточных органелл был использован комплекс биохимических показателей, включающих оценку активности ферментных систем различной клеточной локализации и характеризующих проницаемость биологических мембран. Изучали свободную активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) методом Нордмана в модификации Путилина Ф.Е. и Ещенко Н.Д. в митохондриальной фракции, а также свободную активность  $\beta$ -галактозидазы и глюкозо-6-фосфатазы (Г-6-Ф) в надмитохондриальной фракции.

Статистическую достоверность различий определяли по критерию t Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Как показали исследования, на 30 сутки эксперимента внутрижелудочное введение ФКМЦ приводит к достоверным изменениям всех регистрируемых показателей, характеризующих перекисные процессы в сыворотке экспериментальных

животных. Так, содержание МДА, КПБ, битирозина в сыворотке крови увеличивается соответственно на 48%, 44% и 56%, а интенсивность флуоресценции триптофана снижается на 22%. В печени подопытных крыс интоксикация, вызванная введением ФКМЦ, сопровождается отчетливой тенденцией усиления перекисных процессов, что находит отражение в увеличении количества МДА (на 33%) и КПА (на 30%). К концу эксперимента, на 60-е сутки, уровень свободно-радикальных процессов, а следовательно и содержание продуктов перекисидации белков и липидов в организме экспериментальных животных остается значительно выше контрольных значений. Содержание МДА и КПБ увеличивается соответственно на 69% и 60%. При этом концентрация битирозина возрастает на 38%, а интенсивность флуоресценции остатков триптофана снижается на 20%. Направленность и выраженность перекисных процессов в печени экспериментальных животных носит характер, аналогичный выше описанному. После двух месяцев введения ФКМЦ наблюдается возрастание количества МДА и КПБ в печени опытных животных соответственно на 31% и 53% (см. таблицу).

Развитие ОС во многом определяется соотношением между антиоксидантной и прооксидантной системами. Учитывая то, что компоненты ФКМЦ обладают сильными прооксидантными способностями, анализ состояния АОС имеет определяющее значение в оценке выраженности и глубины ОС. На фоне ОС, вызванного ФКМЦ, на 30-е сутки наблюдается снижение содержания ЦП в сыворотке крови на 36% и тенденция к возрастанию активности эритроцитарной Г-6-ФДГ (на 16%). В дальнейшем (на 60 суток эксперимента) реакция АОС имеет более выраженный характер. Так, увеличение активности эритроцитарной Г-6-ФДГ достигает достоверных величин и составляет 124% по сравнению с контролем. Тенденцию к увеличению активности проявляет эритроцитарная СОД (на 29%). В этот период, как и ранее, отмечается снижение содержания ЦП на 37%. Воздействие ФКМЦ в течение 60 суток приводит к выраженной депрессии некоторых компонентов АОС гепатоцитов. Указанное проявляется снижением активности ГР и Г-6-ФДГ соответственно на 46% и 34%. Однако, несмотря на угнетение функционирования ферментов рецелирования глутатиона, концентрация ГВ достоверно превышает уровень контроля на 14% (см. таблицу).

Таблица. Состояние процессов перекисного окисления и функционирование АОС организма белых крыс при повторном внутрижелудочном введении ФКМЦ

Показатель	Группы сравнения		
	Контроль	Через 30 суток после введения	Через 60 суток после введения
<b>Показатели характеризующие перекисные процессы</b>			
МДА в сыворотке крови, нмоль/мл	4,8 ± 0,46	7,1 ± 0,87*	8,1 ± 0,73**
МДА в печени, нмоль/г	39,7 ± 3,67	52,8 ± 5,13^	51,9 ± 5,44^
КПА в сыворотке крови, мкмоль/мл	24,5 ± 2,62	35,4 ± 2,33*	39,3 ± 3,06**
КПА в печени, моль/г	0,47 ± 0,042	0,61 ± 0,052^	0,72 ± 0,057**
Флуоресценция триптофана, у.е	8,6 ± 0,34	6,7 ± 0,39**	6,9 ± 0,26**
Флуоресценция битирозина, у.е.	0,55 ± 0,053	0,86 ± 0,057**	0,76 ± 0,060*
<b>Показатели характеризующие состояние АОС</b>			
ЦП в сыворотке, мг/л	345,0 ± 33,01	222,1 ± 17,08**	218,0 ± 0,66**
СОД в эритроцитах, мкг/мл	25,3 ± 3,12	25,0 ± 2,37	32,7 ± 1,13^
СОД в печени, мкг/г	153,8 ± 14,16	186,6 ± 29,02	150,7 ± 13,90
ГВ в эритроцитах, мг%	33,2 ± 3,03	36,7 ± 6,55	36,1 ± 6,41
ГВ в печени, мг%	116,2 ± 4,28	126,0 ± 6,14	132,4 ± 5,08*
Г-6-ФДГ в эритроцитах, ммольНАДФН <sub>2</sub> /мин на г Нв	38,0 ± 1,86	44,3 ± 2,79^	47,3 ± 3,91*
Г-6-ФДГ в печени, ммольНАДФН <sub>2</sub> /мин на мг белка	69,6 ± 7,17	58,1 ± 4,14	46,0 ± 3,13*
ГР в эритроцитах, мкмольНАДФН <sub>2</sub> /мин на мг белка	16,4 ± 0,84	16,1 ± 1,08	15,7 ± 1,02
ГР в печени, мкмольНАДФН <sub>2</sub> /мин на мг белка	157,5 ± 12,03	128,5 ± 10,82	85,4 ± 4,48***

Примечание. Здесь и далее: ^ - достоверные изменения по сравнению с контролем при  $0,05 < p < 0,01$ ; \* -  $P < 0,05$ ; \*\* -  $P < 0,01$ , \*\*\* -  $P < 0,001$ .

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том что, субхроническое внутрижелудочное поступление ФКМЦ вызывает интенсификацию окислительных процессов в сыворотке крови и печени экспериментальных животных. Причем выраженность окислительных процессов выше в сыворотке крови, чем в тканях печени, что указывает на истощение антиоксидантных возможностей сыворотки крови. Это подтверждается характером изменений основного антиоксиданта внеклеточной среды – ЦП. Концентрация которого значительно снижается в экспериментальных группах, что, вероятно, обусловлено свободнорадикальным повреждением ЦП. Известно, что действие АФК на ЦП приводит к потере феррооксидазной активности и увеличению чувствительности ЦП к протеолизу [3]. Изменение активности Г-6-ФДГ в эритроцитах, вероятно, связано с поддержанием процессов, требующих большого количества НАДФН<sub>2</sub>, например, таких, как восстановление глутатиондисульфида и носит адаптационно-приспособительный характер. В противоположность этому, снижение в печени активности ГР и Г-6-ФДГ может быть обусловлено окислительной модификацией ферментов. Ранее было показано, что увеличение содержания АФК в клетке сопровождается разрушением основных ферментов антиоксидантной защиты таких, как СОД, глутатионпероксидаза, каталаза [4, 6].

Перекисное окисление является одним из основных процессов повреждения внутриклеточных мембранных структур, играет исключительную роль в клеточной патологии, сопровождается деформацией мембранного липопротеидного комплекса и выходу ферментов-маркеров органелл в протоплазму клетки. Измерение свободной активности этих ферментов может служить надежным критерием оценки проницаемости внутриклеточных мембран [1]. На рисунке представлены результаты измерения свободной активности маркерных ферментов лизосом, митохондрий и микросом, из которых следует, что на 30 сутки введения ФКМЦ наблюдается отчетливая тенденция к росту свободной активности  $\beta$ -галактозидазы (на 23%) – матричного фермента лизосом, а также достоверное увеличение свободной активности СДГ (на 36%) – мембраноструктурированного фермента митохондрий. Аналогичные изменения зарегистрированы на 60 сутки эксперимента. Рост свободной активности  $\beta$ -галактозидазы и СДГ превышает контрольные величины соответственно на 45% и 38%.

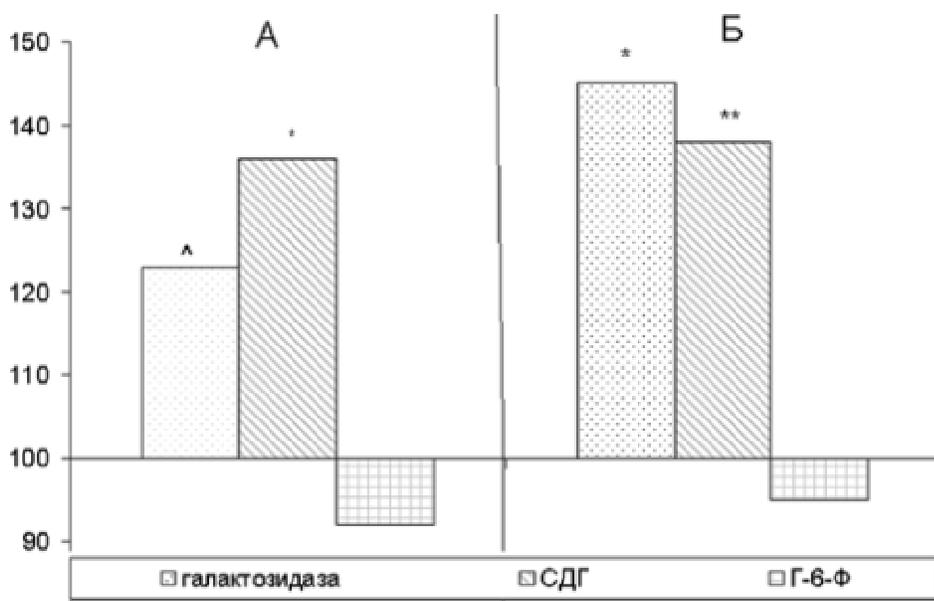


Рисунок. Свободная активность ферментов-маркеров лизиса внутриклеточных мембран (в % по отношению к контролю; контроль принят за 100%).

Примечание: А – 30 суточное внутрижелудочное введение ФКМЦ, В – 60 суточное внутрижелудочное введение ФКМЦ.

Резюмируя выше изложенное, можно констатировать, что общим характером токсического действия ФКМЦ является дисфункция АОС, сопровождаемая нарушением ферментной организации клетки и целостности мембранных структур. По нашему мнению в основе описанных изменений лежит способность компонентов ФКМЦ, в первую очередь соединений меди, инициировать свободно-радикальные процессы.

Работа выполнена при поддержке ФФИ НАН РБ (№ 151-Б03 от 14.04.03 г.).

#### Литература

1. Меркурьева Р.В. Метаболические механизмы биоэффектов факторов окружающей среды как основа классификация биохимических методов по приоритетности. В сб. Современные биохимические методы в гигиене окружающей среды. М.: 1982. С. 11 –32.

2. Трахтенберг И.М., Колесников В.С., Луковенко В.П. Тяжелые металлы во внешней среде: современные гигиенические и токсикологические аспекты. Мн.: Навука і тэхніка, 1994, 285 с.
3. Шаронов Б.П., Говорова Н.Ю., Лызлова С.Н. Антиокислительные свойства и деградация белков сыворотки крови активными формами кислорода ( $O_2\cdot$ ,  $OCl\cdot$ ), генерируемыми стимулированными нейтрофилами. Биохимия.1988. Т. 53. вып. 5. С. 816 – 824.
4. Dean R.T., Fu S., Stocker R., Davies M.J. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. The Biochemical Journal. 1997. Vol. 324. P. 1 – 18.
5. Gaetke L.M., Chow C.K. Copper toxicity, oxidative stress and antioxidant nutrients. Toxicology. 2003. Vol. 189. P. 147 – 163.
6. Pigeolet E., Remacle J. Susceptibility of glutathione peroxidase to proteolysis after oxidative alteration by peroxides and hydroxyl radicals. Free Radical Biology & Medicine. 1991. Vol. 11. P. 191 – 195.
7. Powell R. The Antioxidant Properties of Zinc. Journal of Nutrition. 2000. Vol. 130. P. 1447 – 1454.