

УДК 577.3 + 615.9

Г. Л. АНТОНЯК^{1,2}, докт. біол. наук, професор,**Р. О. ФЕДЯКОВ**², аспірант,**Н. К. КОВАЛЬ**^{2,3}, аспірант.¹ Львівський національний університет імені Івана Франка,
вул. Дорошенка, 41, Львів, 79000, Україна² Інститут біології тварин НААН України, лабораторія обміну речовин,
вул. Стуса, 38, Львів, 79003, Україна³ Дрогобицький державний педагогічний університет
імені Івана Франка,
вул. Івасюка, 11, Трускавець, 82200, Україна,
e-mail: halyna_antonyak@yahoo.com

ВПЛИВ АФЛАТОКСИНУ В1 НА ПРОЦЕСИ ПЕРОКСИДНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ ТА АНТИОКСИДАНТНУ СИСТЕМУ ЕРИТРОЦИТІВ І ГЕПАТОЦИТІВ ЩУРІВ

Провалили дослідження впливу афлатоксину В1 (AFB1) за умов одно-разового парентерального введення в дозі 0,5 мг/кг на процеси пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) та активність ферментів антиоксидантної системи в еритроцитах і гепатоцитах щурів. Установлено, що на 7-му і 14-ту доби експерименту в клітинах тварин відбувається інтенсифікація ПОЛ та пригнічення активності ферментів-антиоксидантів (супероксиддисмутаза, глутатіонредуктаза). Це свідчить, що одним із механізмів патогенної дії афлатоксинів може бути індукція процесу утворення вільних радикалів та ініціація реакцій пероксидного окиснення ліпідів, що призводить до зниження антиоксидантного захисту.

Ключові слова: афлатоксин В1, мікотоксини, пероксидне окиснення ліпідів, антиоксидантна система, еритроцити, гепатоцити, щури.

Афлатоксин В1 (AFB1) — це продукт вторинного метаболізму мікроскопічних грибів роду *Aspergillus*, головним чином *A. flavus*. Як і інші афлатоксини, AFB1 часто виявляється в кормах тварин, а іноді — і в продуктах харчування людини за умов забруднення їх грибами-продуцентами [1, 3, 4]. Найчастіше цим та іншими афлатоксинами забруднюються зернові та олійні культури, а також спеції, горіхи. За хімічною структурою AFB1 належить до фурокумаринів [13].

Афлатоксин В1 — це один із найбільш небезпечних мікотоксинів, оскільки він здатний спричиняти інтенсивні ураження організму тварин і людини впродовж короткого періоду часу. Він виявляє мутагенні, канцерогенні, тератогенні та імуносупресивні властивості [13, 14]. Навіть за концентрацій 20—200 мкг/кг AFB1 знижує продуктивність, інтенсивність росту і стан здоров'я тварин [4]. За високих рівнів надходження до організму цей токсин зумовлює отруєння — афлатоксикоз [15]. Однак біохімічні механізми розвитку захворювання та порушення життєвих функцій організму тварин і людини за умов надходження афлатоксину В1 з кормами та харчовими продуктами нині досліджені недостатньо.

Як відомо, одним із найважливіших показників функціонального стану клітин є стан антиоксидантної системи, яка захищає клітини від ушкоджень, зумовлених дією активних форм кисню (АФО). Утворення останніх зростає під впливом різноманітних токсикантів [14, 11]. У низці досліджень встановлено, що в механізмі токсичної дії багатьох токсинів грибів-мікроміцетів важливе значення має їхній стимулюючий вплив на процеси пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) та пригнічення природних захисних систем організму [3]. Що стосується афлатоксину В1, то вплив цього мікотоксину на процеси ПОЛ та антиоксидантну систему клітин з'ясований мало. Це зумовлює актуальність досліджень впливу АFB1 на антиоксидантну систему гепатоцитів та еритроцитів, оскільки ці клітини відіграють надзвичайно важливу роль у життєдіяльності організму.

Метою дослідження було вивчення процесів ПОЛ і супероксиддисмутази та глутатіонредуктази активності в гепатоцитах та еритроцитах білих безпородних щурів за умов одноразового введення афлатоксину В1 в дозі, що становить 1/10 LD50 — 0,5 мг/кг маси.

Матеріали та методи дослідження

Експерименти провадили на дорослих білих безпородних щурах — самцях масою 170—200 г, яких утримували на стандартному раціоні в умовах віварію. Тварин поділяли на три групи: контрольну (К) і дві дослідні (Д1, Д2), по 5 особин у кожній. Тваринам дослідних груп одноразово вводили АFB1 в дозі 0,5 мг/кг маси, тваринам контрольної групи — фізіологічний розчин. Дослідження провадили на 7-му і 14-ту доби після введення токсину. Евтаназію тварин здійснювали під легким ефірним наркозом, дотримуючись правил поводження з експериментальними тваринами.

Зразки печінки, відібрані зразу ж після евтаназії, охолоджували до температури 1—3°C у фізіологічному розчині, підсушували фільтрувальним папером, а потім подрібнювали ножицями та гомогенізували в 0,05 М тріс-НСl буфері (рН 7,5) з додаванням 0,25 М сахарози. Співвідношення маси тканини до об'єму буферу становило 1 : 9. Одержані гомогенати центрифугували при 10 000 г впродовж 30 хв., використовуючи для досліджень надосадову рідину.

Кров збирали в пробірки з гепарином, відділяли плазму центрифугуванням, а еритроцити тричі промивали 0,9% NaCl, щоразу центрифугуючи суспензію клітин при 3 000 г впродовж 5 хв. Гемолізати отримували трикратним заморожуванням — відтаюванням суспензій, приготованих додаванням до еритроцитів бідистильованої води, з подальшим центрифугуванням при 10 000 г впродовж 15 хв. на рефрижераторній центрифугі.

У гемолізатах і гомогенатах печінки визначали концентрацію продуктів, які взаємодіють з тіобарбітуровою кислотою (ТБК-активні продукти) [12], і активність ферментів антиоксидантної системи (супероксиддисмутаза, глутатіонредуктаза). Супероксиддисмутази активність визначали за рівнем гальмування ферментом процесу відновлення нітросинього тетразолію за присутності NADP і феназинметасульфату [2]. Активність глутатіонредуктази визначали, враховуючи швидкість окиснення молекул NADPH [6]. Вміст білка в гемолізатах визначали методом Лоурі та співавторів [6]. Отримані результати опрацьовували статистично з використанням методів варіаційної статистики [5].

Результати дослідження та обговорення

Як видно з наданих даних (рис. 1), через 7 і 14 дб після введення тваринам АFB1 рівень кінцевих продуктів ПОЛ (ТБК-активні продукти)

зростає і в гепатоцитах, і в еритроцитах тварин. Однак у клітинах печінки збільшення зазначеного показника виразніше, ніж в еритроцитах. Згідно з отриманими результатами, у гепатоцитах цей показник збільшується на 7-му і 14-ту доби експерименту, відповідно, на 52,2% і 117% ($p < 0,05$ — $0,01$), а в еритроцитах — на 19,7% і 27,5% ($p < 0,05$). Це свідчить про розвиток оксидативного стресу, який виявляється в обох типах клітин тварин після введення афлатоксину В1.

Як відомо, оксидативний стрес відбувається у випадках, коли рівень утворення АФО перевищує здатність клітин до детоксикації цих реакційно активних радикалів та сполук [14]. Тому збільшення показника інтенсивності пероксидного окиснення ліпідів, установлене в наших дослідженнях, можна пояснити зниженням антиоксидантного потенціалу клітин.

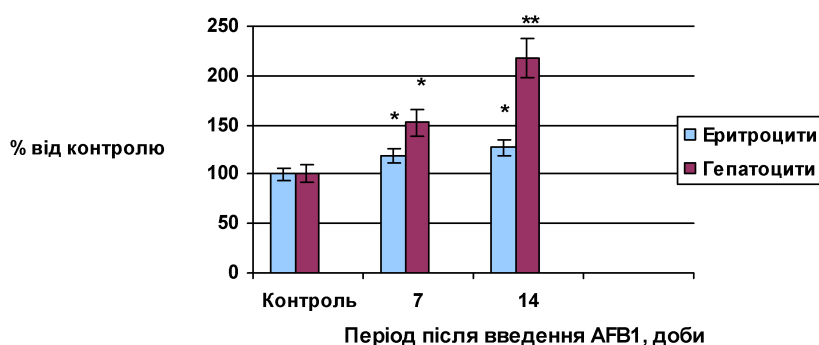


Рис. 1. Вплив афлатоксину В1 на вміст ТБК-активних продуктів у клітинах щурів: на цьому та інших рисунках *, ** — вірогідність різниць між контрольною і дослідними групами тварин (* — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$)

Важливим показником антиоксидантного захисту клітин є активність ферментів антиоксидантної системи [5]. У процесі досліджень установлено, що за умов гострої токсикації афлатоксином В1 в гепатоцитах і еритроцитах піддослідних тварин відбувається зниження активності ферментів-антиоксидантів (супероксиддисмутази, глутатіонредуктази). Отримані результати свідчать, що в досліджуваних клітинах супероксиддисмутазна активність знижується в гепатоцитах — на 34,3% і 46,8% ($p < 0,05$), а в еритроцитах — на 52,5% і 34,8% ($p < 0,05$ — $0,01$), відповідно, на 7-му і 14-ту доби експерименту (рис. 2).

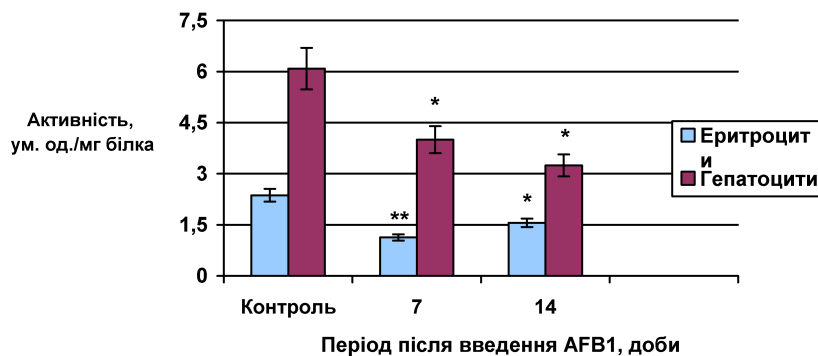


Рис. 2. Вплив афлатоксину В1 на супероксиддисмутазну активність в клітинах щурів

Характерна для еритроцитів і клітин печінки щурів динаміка супероксиддисмутази активності може зумовлюватись інтенсивним накопиченням у цих клітинах продуктів пероксидного окиснення ліпідів, які, як відомо, пригнічують активність ферменту [7].

Стосовно іншого ферменту антиоксидантної системи, глутатіонредуктази, отримані дані вказують на те, що його активність у досліджуваних клітинах щурів також пригнічується впродовж експериментального періоду. Зокрема, в гепатоцитах глутатіонредуктазна активність на 7-му і 14-ту доби експерименту зменшується, відповідно, на 50% і 73,1% ($p < 0,05-0,01$). В еритроцитах активність ферменту вірогідно пригнічується на 55% ($p < 0,01$) на 14-ту добу після введення AFB1 (рис. 3).

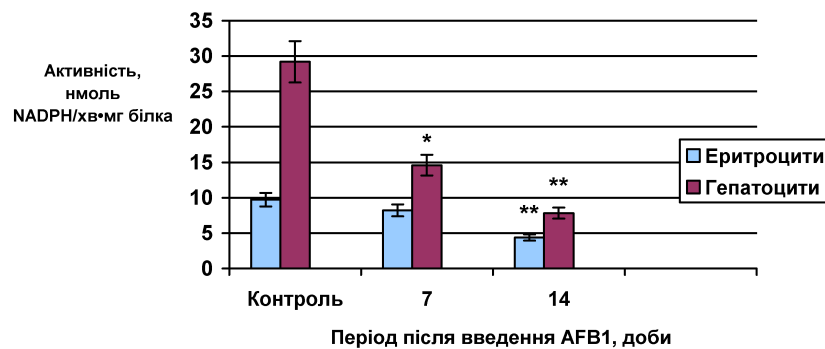


Рис. 3. Вплив афлатоксину В1 на глутатіонредуктазну активність в клітинах щурів

Результати експерименту свідчать, що AFB1 істотно впливає на процеси метаболізму в різних типах клітин — еритроцитах і гепатоцитах, стимулюючи процеси ПОЛ у цих клітинах та пригнічуючи активність ферментів антиоксидантної системи. Як відомо, AFB1 сприяє збільшенню вмісту активних форм кисню в клітинах прямим і опосередкованим шляхом [10]. Реакційно активні АФО індують пероксидне окиснення ліпідів та інші процеси, що призводять до деструктивних змін у клітинах. За таких умов зменшення рівня антиоксидантного захисту клітин в організмі, інтоксикованому афлатоксином В1, може посилювати шкідливий вплив AFB1 на діяльність органів і систем.

Під час вивчення динаміки СОД-активності і вмісту ТБК-активних продуктів в еритроцитах і гепатоцитах щурів за умов введення афлатоксину В1 виявлено пригнічення функціональної активності антиоксидантної системи та інтенсифікацію процесів ПОЛ, що свідчить про важливу роль вільнорадикального окиснення в патогенезі отруєння. Активність СОД і концентрація кінцевих продуктів ПОЛ характеризують окремі етапи вільнорадикального окиснювального процесу. З цього випливає, що визначення активності СОД і вмісту ТБК-активних продуктів дозволяє орієнтуватися в характері вільнорадикального окиснення. На даному етапі дослідження детальний кореляційний аналіз вмісту ТБК-активних продуктів і активності СОД не провадили, це заплановано зробити в подальших дослідженнях.

Одним із механізмів патогенної дії афлатоксинів може бути індукція процесу утворення вільних радикалів та ініціація реакції пероксидного окиснення ліпідів. У багатьох випадках утворення вільних радикалів може становити одну з ланок у механізмах токсичності, більш суттєву, ніж пряме ушкодження клітин. Активація вільнорадикальних процесів,

як правило, призводить до зниження антиоксидантного захисту. Дослідження стану про-антиоксидантного балансу еритроцитів і гепатоцитів щурів при дії афлатоксину В1 вказує на активацію процесу пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), про що свідчить підвищення рівня утворення у хворих тварин продуктів пероксидації ліпідів і зниження антиоксидантного захисту.

Перш за все, установлені зміни можуть бути однією з ланок механізмів токсичного впливу АFB1 на печінку, зумовлюючи порушення її функціональної активності. Адже відомо, що цей орган є головною мішенню руйнівного впливу афлатоксинів [8]. Водночас отримані результати щодо пригнічення активності антиоксидантних ферментів в еритроцитах свідчать про можливі порушення кисень-транспортної функції цих клітин в організмі тварин за умов надходження афлатоксину В1.

Одержані результати служать основою для подальших досліджень механізмів токсичного впливу АFB1 та інших афлатоксинів у клітинах органів-мішеней тварин, а також можливості корекції порушень метаболізму в організмі за умов отруєння афлатоксинами.

Висновки

1. Під впливом одноразового парентерального введення афлатоксину В1 (0,5 мг/кг) в еритроцитах і гепатоцитах білих безпородних щурів на 7-му і 14-ту добу експерименту відбувається інтенсифікація утворення ТБК-активних продуктів, що свідчить про активацію в цих клітинах процесів ПОЛ.

2. Афлатоксин В1 пригнічує активність ферментів антиоксидантної системи супероксиддисмутази та глутатіонредуктази еритроцитів і гепатоцитів щурів.

Література

1. Антоняк Г. Л., Бабич Н. О., Стефанишин О. М. та ін. Афлатоксини: Їхні біологічні ефекти та механізми впливу на організм тварин і людини // Біологія тварин. — 2009. — Т. 11. — № 1-2. — С. 16–26.

2. Дубинина Е. Е., Сальникова Л. А., Ефимова Л. Ф. Активность и изоферментный спектр супероксиддисмутазы эритроцитов и плазмы крови человека // Лаб. дело. — 1983. — № 10. — С. 30–33.

3. Коляденко В. Г., Степаненко В. І., Кравченко В. А. Мікотоксини плісеневих грибів: гепатотоксична, нефротоксична, канцерогенна, мутагенна та ембріотоксична дія // Мікологія. — 2002. — № 1. — С. 47–50.

4. Котик А. Н. Микотоксикозы птиц. — Донецк: Донеччина, 1999. — 267 с.

5. Лапач С. Н., Чубенко А. В., Бабич П. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. — М.: Морион, 2001. — 408 с.

6. Прохорова М. И. Методы биохимических исследований. — Л.: Изд-во ЛГУ, 1982. — 272 с.

7. Chance B., Cadenas E. Reactive oxygen intermediates in biochemistry // Ann. Rev. Biochem. — 1986. — Vol. 55. — P. 137–166.

8. Eaton D. L., Groopman J. D. The Toxicology of Aflatoxins. — New York: Acad. Press., 1994. — P. 383–426.

9. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: a personal view // Nutr. Rev. — 1994. — Vol. 52. — N 8. — P. 253–265.

10. *Shen H. M., Shi C. Y., Shen Y., Ong C. N.* Detection of elevated reactive oxygenspecies level in cultured rat hepatocytes treated with aflatoxin B1 // *Free Rad. Biol. Med.* — 1996. — Vol. 21. — P. 139–146.
11. *Sies H.* Oxidative stress: introduction. — *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*, 1991. — P. 15–22.
12. *Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K.* Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction // *Anal. Biochem.* — 1979. — Vol. 95. — P. 351–358.
13. *Ueno Y.* The toxicology of mycotoxins // *CRC Crit. Rev. Toxicol.* — 1985. — Vol. 14. — P. 99–132.
14. *Wang J. S., Groopman J. D.* DNA damage by mycotoxins // *Mutat. Res.* — 1999. — Vol. 424. — P. 167–181.
15. *Williams J. H. et al.* Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions // *Am. J. Clin. Nutr.* — 2004. — Vol. 80. — P. 1106–1122.

Г. Л. Антоняк^{1,2}, Р. О. Федяков², Н. К. Коваль^{2,3}

¹ Львовский национальный университет имени Ивана Франко,
ул. Дорошенко, 41, Львов, 79000, Украина

² Институт биологии животных НААН Украины, лаборатория обмена веществ,
ул. Стуса, 38, Львов, 79003, Украина

³ Дрогобичский государственный педагогический университет
имени Ивана Франко,
ул. Ивасюка, 11, Трускавец, 82200, Украина,
e-mail: halyna_antonyak@yahoo.com

ВЛИЯНИЕ АФЛАТОКСИНА В1 НА ПРОЦЕССЫ ПЕРОКСИДНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И АНТИОКСИДАНТНУЮ СИСТЕМУ ЭРИТРОЦИТОВ И ГЕПАТОЦИТОВ КРЫС

Резюме

Проводили исследование влияния афлатоксина В1 (AFB1) в условиях однократного парентерального введения в дозе 0,5 мг/кг на процессы пероксидного окисления липидов (ПОЛ) и активность ферментов антиоксидантной системы в эритроцитах и гепатоцитах крыс. Установлено, что на 7-е и 14-е сутки эксперимента в клетках животных происходит интенсификация процессов ПОЛ и угнетение активности ферментов-антиоксидантов (супероксиддисмутаза, глутатионредуктаза). Это свидетельствует, что одним из механизмов патогенного действия афлатоксинов может быть индукция процесса образования свободных радикалов и инициация реакции пероксидного окисления липидов, что приводит к снижению антиоксидантной защиты.

Ключевые слова: афлатоксин В1, микотоксины, пероксидное окисление липидов, антиоксидантная система, эритроциты, гепатоциты, крысы.

H. L. Antonyak^{1,2}, R. O. Fedyakov², N. K. Koval^{2,3}

¹ Lviv Ivan Franko National University,
Lviv, Doroshenko Str., 38, 79000, Ukraine

² Institute of Animal Biology, NAAS, Laboratory of Metabolism,
Stus Str., 38, Lviv, 79003, Ukraine

³ Drohobych Ivan Franko State Pedagogical University,
Ivasyuk Str., 11, Truskavets, 82200, Ukraine,
e-mail: halyna_antonyak@yahoo.com

EFFECTS OF AFLATOXIN B1 ON LIPID PEROXIDATION AND ANTIOXIDATAL SYSTEM ON RATS ERYTHROCYTES AND HEPATOCYTES

Summary

The effects of single parenteral injection of aflatoxin B1 (AFB1, 0,5 mg/kg) on the processes of lipid peroxidation (LPO) and antioxidant system enzymes activities in rat erythrocytes and hepatocytes were studied. The intensification of LPO and inhibition of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, glutathione reductase) in animal cells on the 7th and 14th days after AFB1 injection was established. The results suggest that induction of formation of free radicals and initiating lipid peroxidation reactions, leading to a decline of antioxidant protection may represent one of the links in pathogenic mechanisms of aflatoxin action.

Key words: aflatoxin B1, mycotoxins, lipid peroxidation, antioxidant system, erythrocytes, hepatocytes, rat.