

## АКТИВНІСТЬ АНТИОКСИДАНТНИХ ЕНЗИМІВ НИРОК ЩУРІВ ЗА ДІЇ МЕРКУРІЮ ДИХЛОРИДУ

А. Я. ВЕЛИКА, В. П. ПИШАК, І. В. ЛОПУШИНСЬКА

Буковинський державний медичний університет, Чернівці, Україна;  
e-mail: velyka.alla@bk.ru

Солі важких металів виводяться нирками і, як прооксиданти, стимулюють процеси вільнорадикального окислення. Іони ртуті накопичуються в нирках. Тому актуальним є дослідження особливостей адаптивної відповіді антиоксидантних ензимів різних шарів нирок у відповідь на введення ртуті дихлориду. Для з'ясування впливу солей ртуті на антиоксидантну систему нирок в умовах індукованого діурезу важливим є вивчення активності каталази, глутатіонпероксидази в нирках щурів. Встановлено, зниження активності глутатіонпероксидази в кірковому, мозково-мозочковому шарах нирок в умовах водного і сольового навантаження в щурів через 72 год після введення їм розчину ртуті дихлориду (5 мг/кг), що супроводжується підвищенням вмісту продуктів окислювальної модифікації ліпідів і протеїнів та морфологічними змінами в тканині нирок. Одержані результати свідчать про пригнічення ензимів антиоксидантного захисту в нирках щурів за дії ртуті дихлориду.

*Ключові слова:* каталаза, глутатіонпероксидаза, ТБК-активні продукти, продукти окисної модифікації протеїнів, ртуті дихлорид, нирки.

**Н**ирки – основний орган регуляції водно-сольового обміну в організмі людини. Вони виявляють високу вибірковість до зміни екскреції води й солей і тому надзвичайно чутливі до дії токсичних речовин, зокрема іонів важких металів [1]. У разі надходження солей ртуті в організм 50% його накопичується в нирках. Слід зазначити, що існує дві форми фіксації ртуті в нирках: лабільна, що визначає рівень його виведення із сечею за рахунок секреторної діяльності клітин, та малорухома форма, яка спричинює поступове накопичення цього елемента [2].

Відомо, що токсичний вплив іонів ртуті, спричинений руйнуванням лізосом і вивільненням гідролітичних ензимів, призводить до деградації мембран мітохондрій [3]. Будь-який стресорний чинник зумовлює зміну активності ензимів антиоксидантного захисту нирок щурів [4]. Активація пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ) призводить до значних змін у клітинному обміні та функції біомембран і є важливою ланкою патогенезу багатьох захворювань, у тому числі і нирок [5–7]. Раніше нами було показано [8], що за дії 3%-го сольового навантаження внаслідок інтоксикації ртуті дихло-

ридом ( $\text{HgCl}_2$ ) в нирках щурів активуються процеси вільнорадикального окислення. Важливо також було дослідити стан антиоксидантної системи в нирках щурів за інтоксикації ртуті дихлоридом.

Мета цього дослідження – встановити особливості змін активності ензимів антиоксидантного захисту в нирках щурів за дії ртуті дихлориду в умовах водного та сольового навантаження.

### Матеріали і методи

Дослідження проводили на білих статевозрілих щурах-самцях з масою тіла  $180 \pm 10$  г, що перебували в умовах віварію зі сталим температурним та світловим режимом. Тварин було розподілено на групи: 1-ша – контрольна (інтактні тварини,  $n = 6$ ); 2-га – тварини, які отримували 5%-не водне навантаження (з розрахунку 5 мл води на 100 г маси тіла тварини,  $n = 6$ ); 3-тя – тварини із сольовим навантаженням ( $n = 6$ , введення 0,75% розчину  $\text{NaCl}$ , із розрахунку 0,65 ммоль  $\text{Na}$  (14,8 мг  $\text{Na}$ ) на 100 г маси тіла тварини); 4-та – тварини, яким підшкірно вводили 0,1%-ий розчин  $\text{HgCl}_2$  (5 мг/кг) і через 72 год після дії  $\text{HgCl}_2$  проводили 5%-не водне наван-

таження ( $n = 6$ ); 5-а – тварини, яким підшкірно вводили 0,1%-ий розчин  $\text{HgCl}_2$  (5 мг/кг) і через 72 год після ін'єкції проводили сольове навантаження ( $n = 6$ ) [9]. Вплив  $\text{HgCl}_2$  на показники, що вивчалися, досліджували в умовах індукованого водного та сольового діурезу і порівнювали зі значеннями 2-ї (водне навантаження) та 4-ї (сольове навантаження) груп. Навантаження здійснювали шляхом внутрішньошлункового введення через металевий зонд. Після 2 год навантаження проводили евтаназію тварин шляхом декапітації під легким ефірним наркозом. Досліди проводили відповідно до вимог Європейської конвенції із захисту експериментальних тварин (86/609 ЄС). Після декапітації швидко відбирали нирки, ретельно висушували фільтрувальним папером та розділяли на шари: кірковий, мозковий і сосочковий. Наважку шарів нирок (500 мг) гомогенізували у 50 мМ трис- $\text{HCl}$  буфері (рН 7,4), що містив 0,1% розчину ЕДТА та центрифугували 10 хв при 900 g. Усі операції проводили при температурі не вище + 4 °С. У пост'ядерних супернатантах шарів нирок визначали такі показники: 1) вміст ТБК-активних продуктів (ТБК-АП) за реакцією між малоновим альдегідом (похідні) і тіобарбітуровою кислотою (ТБК), яка в умовах високої температури і кислого середовища (рН 3,0) утворює триметинний комплекс рожевого кольору. Величину поглинання забарвленого розчину вимірювали на фотоелектроколориметрі КФК-3 при  $\lambda$  532 нм. Кількість ТБК-АП виражали в мкмоль/г тканини [10]; 2) вміст продуктів окисної модифікації протеїнів (ПОМП) за реакцією з 2,4-динітрофенілгідразином. Величину поглинання 2,4-динітрофенілгідразонів вимірювали на спектрофотометрі СФ-46 при  $\lambda$  370 нм і виражали в одиницях абсорбції на грам тканини (о.абс./г тканини) [11]; 3) активність каталази (1.11.1.6) за реакцією незруйнованого пероксиду гідрогену з амонієм молібдатом. Величину поглинання забарвленого комплексу вимірювали на СФ-46 за  $\lambda$  410 нм. Активність ензиму в супернатанті нирок виражали в мкмоль за хв на г тканини [12]; 4) активність глутатіонпероксидази (1.11.1.9) за кількістю відновленого глутатіону, який було використано за знешкодження пероксиду гідрогену в глутатіонпероксидазній реакції [13]. Величину поглинання відновленого глутатіону вимірювали за  $\lambda$  262 нм на спектрофотометрі

СФ-46. Активність ензиму в нирках виражали в нмолях відновленого глутатіону за 1 хв на 1 мг протеїну. Для морфологічної оцінки зразки забарвлювали гематоксиліном і еозином [14]. Під час мікроскопії використовували такі параметри об'єктива та окуляра – Об.  $\times 10$ , Ок.  $\times 20$  ( $\times 200$ ). Статистичну обробку даних проводили на комп'ютері за допомогою програми «Excel-7». Вірогідність різниці оцінювали за  $t$ -критерієм Стьюдента [15].

### Результати та обговорення

Меркурію дихлорид належить до ренальних отрут. Відомо [16], що токсичний вплив препарату на нирки зберігається протягом трьох тижнів після його введення. Нами показано, що вже на ранніх стадіях дії препарату (через 72 год після ін'єкції) відбуваються морфологічні зміни у структурі нирок (рис. 1). Так, в інтактних шурів у кірковому шарі тканин нирок іноді трапляються окремі клітини з явищами клазматозу – сепарацією і виходом у просвіт каналців фрагментів апікальної частини цитоплазми. Такі фрагменти у достатньо великій кількості згодом дистальніше можуть утворювати зернисті або гіалінові циліндри, однак це не патологічний стан. У тварин, яким вводили розчин меркурію дихлориду, спостерігаються глибокі морфологічні зміни, в першу чергу в епітелії проксимальних каналців кіркової речовини нирки. Зокрема, відмічено коагуляційний некроз у проксимальних каналцях нирок ( $39,4 \pm 3,6\%$ ). Варто зазначити, що кількість уражених некрозом епітеліоцитів підрахувати неможливо з причини явища каріолізу – повного зруйнування ядер. Можна констатувати 100%-не ураження епітеліоцитів проксимальних каналців нирок альтеративним процесом. Просвіт більшості звивистих каналців заповнений повністю або частково фрагментами некротизованих і десквамованих клітин (рис. 1). Подібні зміни морфологічної структури нирок спостерігали за дії тетрахлорметану [17, 18]. Автори показали зміну епітелію проксимального сегмента нефрону, поширену зернисту дистрофію клітин звивистих каналців, каламутність цитоплазми, нечіткі контури ядра, що є проявом гідропічного набухання клітин.

Введення тваринам  $\text{HgCl}_2$  (5 мг/кг) призводить до зміни функціонального стану нирок. Так, виявлено, що в умовах водного наванта-

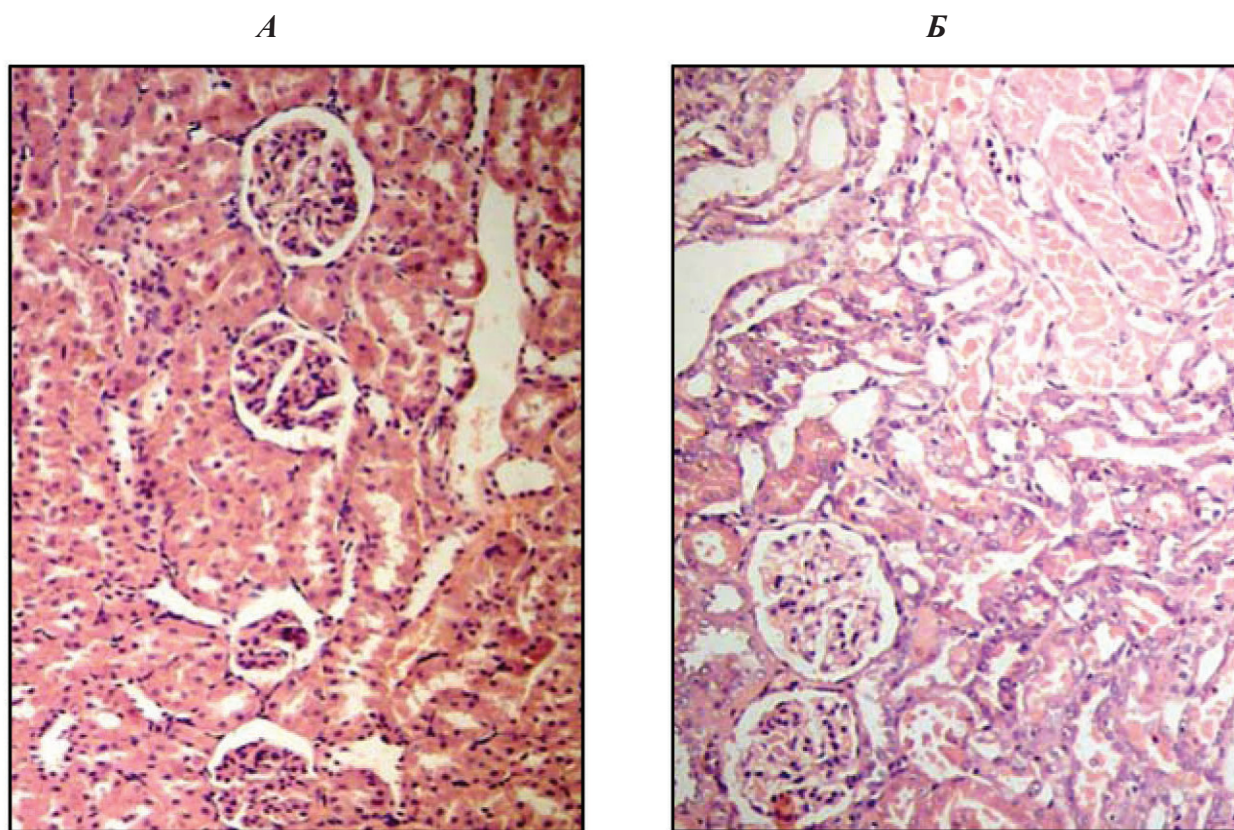


Рис. 1. Гістологічний зріз кіркового шару нирок щурів: А – контроль, Б – меркурію дихлорид. Фарбування гематоксилином і еозином. Об.  $\times 10$ , Ок.  $\times 20$  ( $\times 200$ )

ження введення  $\text{HgCl}_2$  призводить до зростання екскреції креатиніну, сечовини, протеїну, підвищення величини діурезу та показника клубочкової фільтрації [19]. Аналогічні зміни функціонального стану нирок щурів у разі токсичної нефропатії, індукованої комбінованим навантаженням тетрахлорметану та меркурію дихлориду описано в роботі [17].

Раніше нами було показано [20], що зміни про-/антиоксидантного стану крові щурів, яким вводили  $\text{HgCl}_2$ , супроводжувалися різким зростанням вмісту ТБК-АП, як в умовах водного (90%), так і сольового навантаження (85%). Про-/антиоксидантна рівновага в крові підтримувалася переважно за рахунок високої активності каталази, яка зростала в крові тварин, що отримували  $\text{HgCl}_2$ , у 2 рази в умовах водного навантаження і на 79% в умовах сольового навантаження. Активність глутатіонпероксидази знижувалась у 2 рази.

У тканині нирок активність цього ензиму, в умовах водного навантаження знижується у 3,5 рази в кірковому та мозковому шарах нирок,

що призводить до зростання не тільки ТБК-АП продуктів, а й продуктів пероксидного окислення протеїнів – 2,4-динітрофенілгідрозонів (рис. 2, 3). Встановлено, що в умовах водного та сольового навантаження щурів введення  $\text{HgCl}_2$  супроводжується активацією вільнорадикального окислення в усіх досліджуваних шарах нирок щурів. Так, вміст ТБК-АП у кірковому шарі та сосочку за введення  $\text{HgCl}_2$ , у разі водного навантаження зріс на 22% відповідно до значень показників у тварин 2-ї групи, а внаслідок сольового навантаження встановлено зростання цього значення на 23% в кірковому і на 30% у сосочковому шарі нирок порівняно з показниками 4-ї групи.

Окислювальної модифікації за введення  $\text{HgCl}_2$  зазнали і протеїни нирок, про що свідчить зростання вмісту 2,4-динітрофенілгідрозонів в умовах водного навантаження на 86% – в кірковому, на 72% – в мозковому та в 5 разів – в сосочковому шарах нирок, а в разі сольового навантаження на 81% – в кірковому, 90% – в мозковому та у 3 рази – в сосочковому шарі.

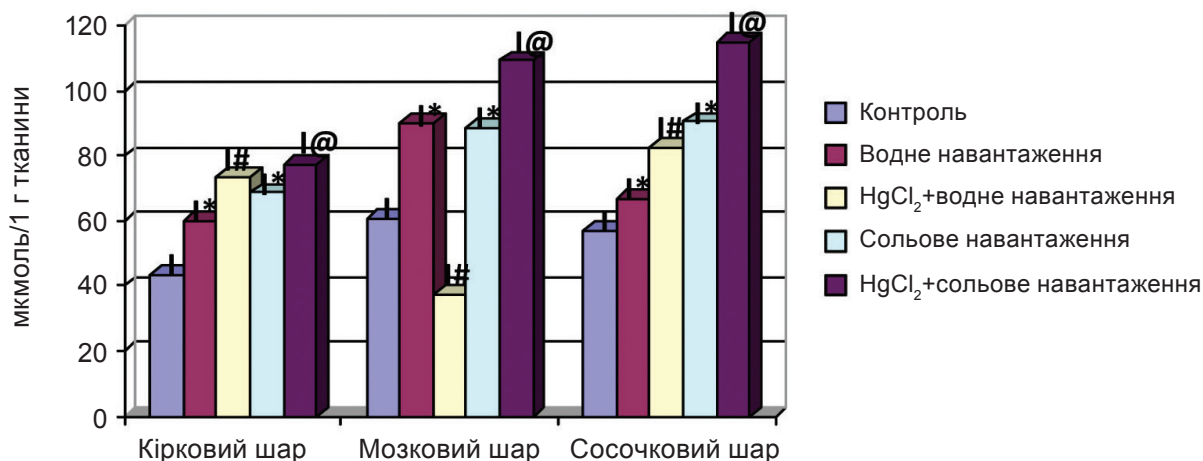


Рис. 2. Вміст ТБК-активних продуктів у нирках щурів за дії ртутію дихлориду в умовах водного та сольового навантаження. Тут і на рис. 3, 4, 5 \*вірогідні зміни порівняно з показниками контрольної групи тварин ( $P < 0,05$ ); #вірогідні зміни порівняно з показниками групи тварин з водним навантаженням ( $P < 0,05$ ); @вірогідні зміни порівняно з показниками групи тварин із сольовим навантаженням ( $P < 0,05$ )

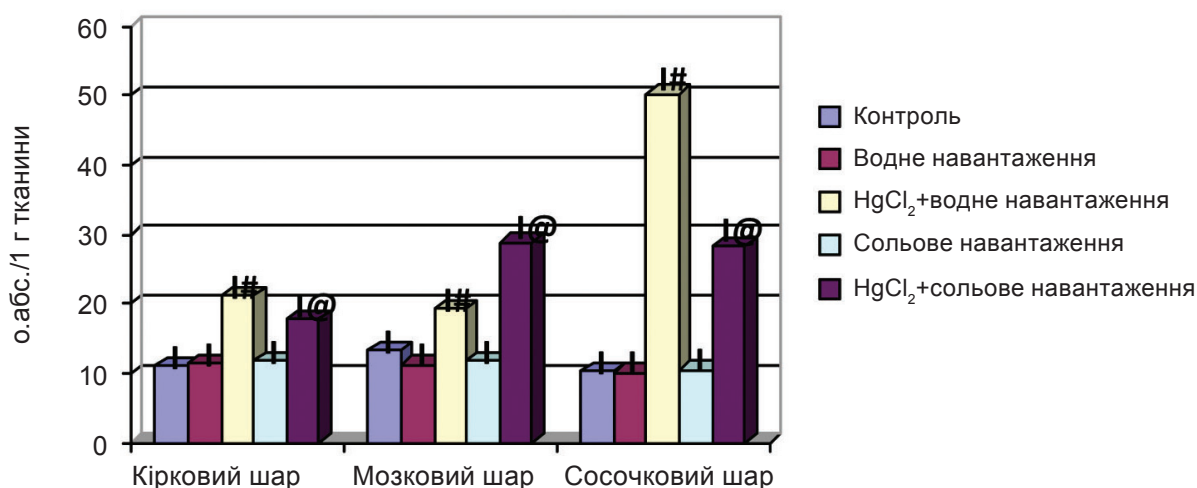


Рис. 3. Вміст продуктів окисної модифікації протеїнів (похідних 2,4-динітрофенілгідразонів) у нирках щурів за дії ртутію дихлориду в умовах водного та сольового навантаження

Посилення окислювальної модифікації протеїнів і ліпідів у тканинах нирок за введення HgCl<sub>2</sub> пов'язано, на нашу думку, з різким пригніченням ензимів системи антиоксидантного захисту. Про це свідчить зниження активності глутатіонпероксидази в усіх шарах нирок приблизно в 3 рази як в умовах водного, так і сольового навантаження (рис. 4).

За введення HgCl<sub>2</sub> відбувається адаптація антиоксидантної системи нирок до дії цього прооксиданта. Встановлено, що під час водного і сольового навантаження введення HgCl<sub>2</sub>

впливає на активність каталази в усіх шарах нирок (рис. 5). Так, в умовах водного навантаження активність ензиму зростає в кірковому і сосочковому шарах на 27 і 70% відповідно, а в умовах сольового навантаження – в кірковому, мозковому і сосочковому шарах – відповідно на 59, 67 та 58%.

Відомо, що каталаза (ензим антиоксидантної системи) може брати участь у відновленні про-/антиоксидантної рівноваги в умовах дії зовнішніх чинників на організм. Так, раніше було показано [5] підвищення каталазної активності в

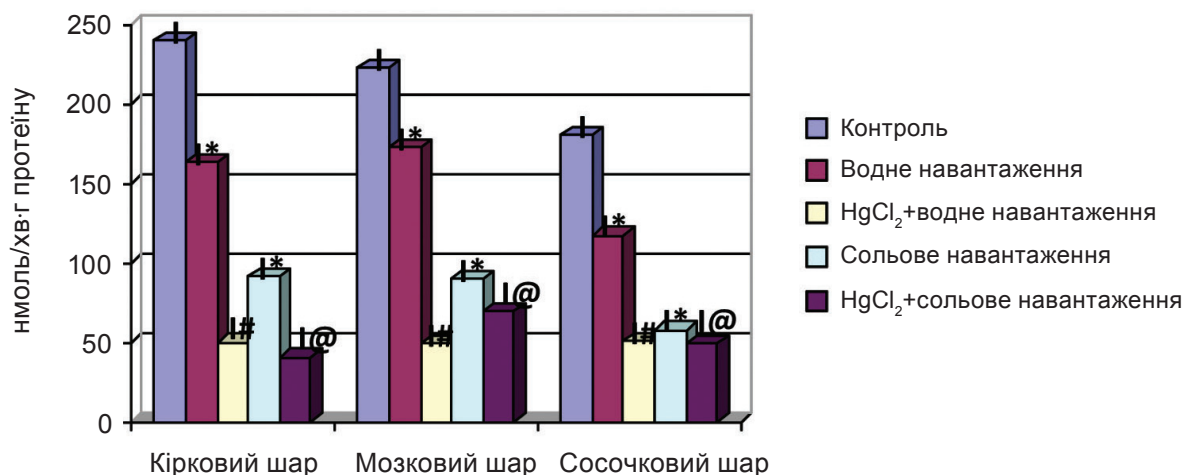


Рис. 4. Активність глутатіонпероксидази в нирках щурів за дії меркурію дихлориду в умовах водного та сольового навантаження

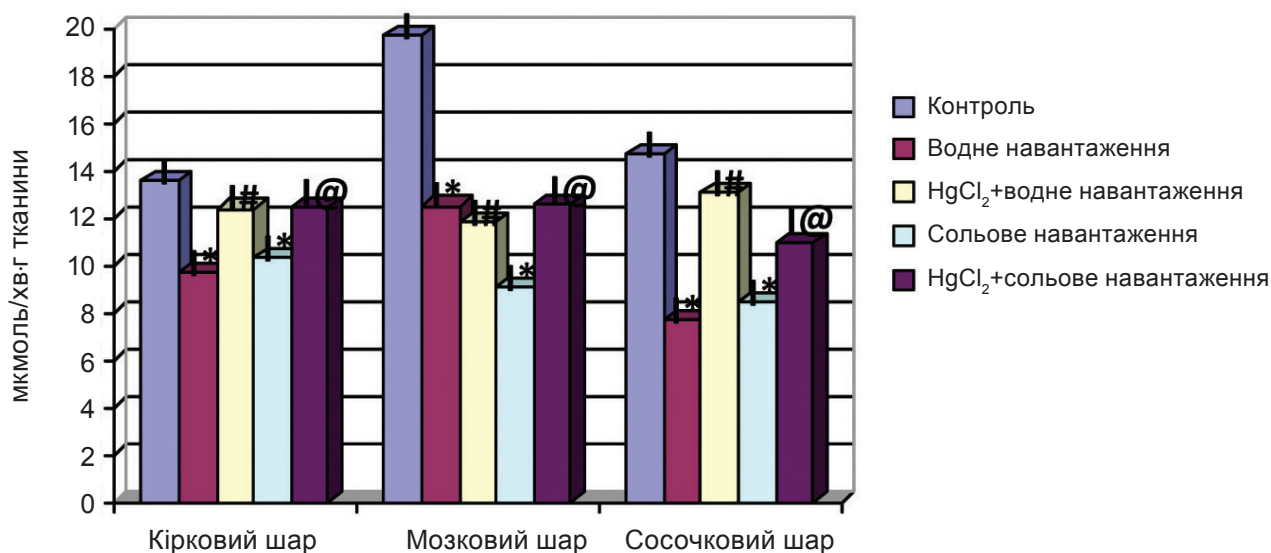


Рис. 5. Активність каталази в нирках щурів за дії меркурію дихлориду в умовах водного та сольового навантаження

нирках щурів в умовах зміненого фотоперіоду. Можливо, підвищення каталазної активності в нирках за дії меркурію дихлориду є одним із механізмів антиоксидантного захисту.

Отже, підшкірне введення 0,1%-го розчину меркурію дихлориду в дозі 5 мг/кг в умовах водного та сольового навантаження призводить до

пригнічення активності глутатіонпероксидази, що супроводжується підвищенням вмісту продуктів окислювальної модифікації протеїнів і ліпідів та морфологічними змінами в тканині нирок. Про-/антиоксидантна рівновага за дії токсиканта підтримується за рахунок підвищення активності каталази.

## АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ЭНЗИМОВ ПОЧЕК КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ МЕРКУРИЯ ДИХЛОРИДА

А. Я. Великая, В. П. Пишак,  
І. В. Лопушинская

Буковинский государственный медицинский университет, Черновцы, Украина;  
e-mail: velyka.alla@bk.ru

Соли тяжелых металлов выводятся почками и, как прооксиданты, стимулируют процессы свободнорадикального окисления. Ионы ртути накапливаются в почках. Поэтому исследование особенностей адаптационного ответа антиоксидантных энзимов разных слоев почек в ответ на введение ртути дихлорида является актуальным. Исследована активность каталазы, глутатионпероксидазы в почках крыс через 72 часа после введения раствора ртути дихлорида (в дозе 5 мг/кг) для выяснения влияния солей ртути на антиоксидантную систему почек. Установлено снижение активности глутатионпероксидазы в корковом, мозговом и сосочковом слоях почек при водной и солевой нагрузке у крыс после введения им ртути дихлорида, которое сопровождается повышением содержания продуктов окислительной модификации липидов и протеинов, а также морфологическими изменениями в ткани почек. Полученные результаты свидетельствуют об угнетении активности энзимов антиоксидантной защиты в почках крыс при введении им ртути дихлорида.

**Ключевые слова:** каталаза, глутатионпероксидаза, ТБК-активные продукты, продукты окислительной модификации протеинов, ртути дихлорид.

## ACTIVITY OF ANTIOXIDANT ENZYMES OF THE RAT KIDNEYS UNDER MERCURY DICHLORIDE EFFECT

A. Ya. Velyka, V. P. Pishak, I. V. Lopushynska

Bukovinian State Medical University,  
Chernivtsi, Ukraine;  
e-mail: velyka.alla@bk.ru

Salts of heavy metals are excreted by the kidneys and, as pro-oxidants, stimulate the processes of free radical oxidation. Mercury ions are accumu-

lated in the kidneys. So the study of the features of antioxidant enzymes adaptive response of different kidney layers in response to mercury dichloride is important. Catalase and glytathionperoxidase activity within rat kidneys 72 hours after mercury dichloride intoxication in the ratio of 5 ml per 1 kg of the animal weight was studied. It was important to reveal the influence of the mercury salts on rat kidney antioxidative system. Decreasing glytathionperoxidase activity in cortical and cerebral substances and renal papillae were accompanied by increased contents of oxidative modified proteins and lipids and morphological changes in renal tissue under salt and water loading after mercury dichloride poisoning. The results obtained evidence for the inhibition of antioxidative protection of enzymes in rat kidneys under the mercury dichloride effect.

**Key words:** catalase, glutathionperoxidase, TBA-active products, products of oxi-modified proteins, mercury dichloride, kidneys.

1. Мельничук Д. О., Мельникова Н. М., Кліх Л. В. та ін. // Сучасні проблеми токсикології. – 2008. – № 3. – С. 18–20.
2. Трахтенберг І. М., Чайковський Ю. Б., Сокурєнко Л. М. // Сучасні проблеми токсикології. – 2008. – № 1. – С. 11–16.
3. Єрмаченко А. І. / Зб. праць «2 міжнародний медичний конгрес студентів і молодих вчених, м. Тернопіль». – 1998 – 168 с.
4. Гончарюк Є. Г., Коршун М. М. // Журн. Акад. мед. наук України. – 2004. – 10, № 1. – С. 131–150.
5. Мацьона І. В., Григор'єва Н. П., Мещишен І. Ф. // Укр. біохім. журн. – 2010. – 82, № 2. – С. 79–88.
6. Пішак В. П., Білокий В. В., Роговий Ю. Є. // Клін. експерим. патол. – 2005. – 4, № 1. – С. 72–76.
7. Геруш І. В., Григор'єва Н. П., Мещишен І. Ф., Мацьона І. В. Вільнорадикальні механізми токсичного ураження організму тетрахлорметаном та шляхи його корекції препаратами ехінацеї пурпурової і мелатоніном / І. В. Геруш, Н. П. Григор'єва, І. Ф. Мещишен, І. В. Мацьона. – Чернівці: Медичний університет, 2012. – 180 с.
8. Пішак В.П., Велика А.Я., Мацьона І. В. // Укр. журн. клін. лаб. мед. – 2011. – 6, № 4. – С. 38–40.
9. Гоженко А. І., Роговий Ю. Є., Федорук О. С. // Одес. мед. журн. – 2001. – № 5 (67). – С. 16–19.

10. *Владимиров Ю. А.* Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю. А. Владимирова, А. И. Арчаков. – М.: Наука, 1972. – 252 с.
11. *Мецишен І. Ф.* // Бук. мед. вісник. – 1998. – 2, № 1. – С. 156–158.
12. *Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г.* // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.
13. *Геруш І. В., Григор'єва Н. П., Мецишен І. Ф.* // Рац. пропозиція Чернівецького державного медичного інституту № 25/95.
14. *Venerucci F.* // Bio-Optica. – 2001. – N 3. – P. 95.
15. *Ойвин И. А.* // Патол. физиол. – 1960. – 4, № 4. – С. 76–84.
16. *Гоженко А. И., Слученко А. Н.* // Нефрология. – 2006. – 10, № 1. – С. 72–76.
17. *Гончарова Л. В., Кузьменко І. А.* // Актуальні проблеми транспортної медицини. – 2006. – № 2 (4). – С. 43–47.
18. *Мацьона І. В., Мецишен І. Ф., Давиденко І. С.* // Світ медицини та біології. – 2008. – № 4. – С. 50–54.
19. *Великая А. Я., Пишак В. П., Мацена И. В.* // Природные ресурсы, биоразнообразие и перспективы естественнонаучного образования: междунар. науч.- практ. конф.: тезисы докл. – Омск, 2012. – С. 165–167.
20. *Велика А. Я., Пішак В. П., Мацьона І. В.* // Бук. мед. вісник. – 2012. – 16, № 3(63). – С. 30–32.

Отримано 12.04.2013