

ПЕРОКСИДНОЕ ПОВРЕЖДЕНИЕ БЕЛКОВ И ЛИПИДОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ ИНДУЦИРОВАННОЕ СОЛЯМИ ЖЕЛЕЗА И МЕДИ ПИТЬЕВОЙ ВОДЫ

В эксперименте на крысах-самках линии Wistar изучено влияние солей Fe^{2+} и Cu^{2+} на интенсивность свободно-радикального окисления (СРО). Показано, что длительное, 3-месячное поступление солей Fe^{2+} и Cu^{2+} с питьевой водой, превышающее гигиенические нормы в два и четыре раза, сопровождается индукцией СРО, проявляющееся накоплением в сыворотке крови как конечных продуктов липопероксидации (ТБК-реагирующие соединения), так и продуктов окислительной модификации белков (карбонильные соединения, флюоресцирующие окисленные остатки аминокислот). Установлено, что при изолированном поступлении металлов прооксидантное действие сульфата железа более выражено, чем у сульфата меди, а при комбинированном поступлении $\text{FeSO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ и CuSO_4 наблюдается более выраженная индукция СРО по сравнению с изолированным действием металлов в тех же дозах.

Ключевые слова: железо, медь, свободно-радикальное окисление.

Являясь металлами с переменной валентностью (МПВ), железо и медь входят в структуру активного центра многих ферментов, катализируя протекание окислительно-восстановительных реакций (ОВР) *in vivo*. Учитывая высокую значимость ОВР в обеспечении процессов жизнедеятельности живых организмов, в настоящее время общепринято отнесение Fe и Cu к эссенциальным микроэлементам [1]. В то же время, в условиях увеличивающегося загрязнения окружающей среды, высока вероятность повышенного, превышающего физиологические потребности организма, поступления Fe^{2+} и Cu^{2+} в организм человека и животных [2], что может сопровождаться индукцией свободно-радикального окисления (СРО) [3]. Избыточная активация СРО в свою очередь приводит к развитию явления «окислительного стресса» [4], являющегося важным патогенетическим звеном развития многих заболеваний [5]. Несмотря на то, что вопросам санитарно-гигиенического нормирования содержания железа и меди в питьевой воде уделяется большое внимание, некоторые аспекты их действия остаются малоизученными. Так, нет четких данных, указывающих на дозозависимость прооксидантного действия d-металлов, а также на особенности их действия при сочетанном поступлении в организм.

Таким образом, целью настоящего исследования явилось расширение представлений о сопряженности изолированного и сочетанного поступления в организм солей железа и меди с интенсивностью окислительного повреждения белков и липидов.

Материалы и методы исследования

Работа выполнена на 36 крысах-самках линии Wistar в соответствии с «Правилами проведения работ и использования экспериментальных животных» в условиях искусственного освещения и кормления *ad libitum*. В течение недели до начала эксперимента животные находились на карантине в условиях лаборатории. Все животные были разделены на 6 групп, по 6 крыс в каждой. Животные всех групп, за исключением контрольной, в течение 3 месяцев получали с питьевой водой соли Fe^{2+} и Cu^{2+} в концентрациях, превышающих гигиенические нормативы (ГН 2.1.5.1315-03) в два и в четыре раза. Крысы I группы (контроль) получали питьевую воду высшей категории с общей минерализацией менее 250 мг/л; II и III группы – питьевую воду, содержащую $\text{FeSO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ в концентрациях 3 и 6 мг/л соответственно; IV и V группы – питьевую воду, содержащую CuSO_4 в концентрациях равных 4,88 и 9,76 мг/л соответственно; VI группы – питьевую воду, содержащую комбинацию используемых солей Fe^{2+} и Cu^{2+} в концентрациях 3 и 9,76 мг/л соответственно. С целью моделирования реальных условий водопотребления крысы имели неограниченный доступ к питьевой воде. Контроль над количеством потребленной воды производился ежедневно посредством градуированной посуды. По окончании эксперимента животные были умерщвлены путем декапитации под легким эфирным наркозом. Содержание ТБК-реагирующих соединений, отражающих интенсивность ПОЛ, в сыворотке крови определялось спектрофотометрически при длине волны 532 нм на спектрофотометре Genesys 5 (США), с учетом коэффициента молярной экстин-

ции $0,156 \text{ мкмоль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ [6]. Содержание продуктов перекисной модификации белков, карбонильных соединений (КС), определялось спектрофотометрически при длине волны 363 нм на спектрофотометре Genesys 5 (США) по методу Levine [7] в модификации Дубининой [8]. Окислительная модификация отдельных аминокислотных остатков определялась на спектрофлуориметре Varian Cary Eclipse (Австралия) по интенсивности флюоресценции окислительно модифицированных аминокислот и выражалась в ед. флюоресценции (ЕФ)/50 мкл сыворотки. Флюоресценция дитиозина определялась при λ возбуждения (λ_{ex}) 325 нм и λ эмиссии (λ_{em}) 415 нм [9], в то время как интенсивность флюоресценции конъюгатов лизина с продуктами ПОЛ (Лиз-ПОЛ) регистрировалась при $\lambda_{\text{ex}} = 365$ нм и $\lambda_{\text{em}} = 440$ нм [10]. Снижение флюоресценции триптофановых остатков, наблюдаемое при окислении, детектировалось при λ_{ex} и λ_{em} равных 295 нм и 340 нм соответственно. Определение общего белка в сыворотке крови производилось по методу Lowry [11]. Статистическая обработка результатов проводилась с использованием стандартных компьютерных программ с помощью U-критерия Манн-Уитни. Данные представлены в виде средних значений величин (М) $\pm$ ошибка средней (m).

Результаты и их обсуждение

Как видно из данных, представленных в таблице, хроническое избыточное поступление в организм животных солей Fe^{2+} в дозе 6 мг/л и комбинации солей $\text{Fe}^{2+} + \text{Cu}^{2+}$ в дозе 3+4,88 мг/л, соответственно, сопровождается повышением содержания в сыворотке крови ТБК-РС, примерно на 90% и 35%, что свидетельствует об индукции ПОЛ. При этом хроническое поступление в организм животных

солей меди в исследуемых концентрациях не сопровождалось активацией ПОЛ, поскольку концентрация ТБК-РС в сыворотке крови животных IV и V групп практически не отличалась от соответствующих значений контрольной группы.

В сыворотке экспериментальных животных также были определены маркеры окислительного повреждения белков. Полученные данные указывают на пероксидную модификацию белков сыворотки крови при длительном избыточном поступлении солей Fe^{2+} и Cu^{2+} с водой, что проявляется повышением концентрации КС в сыворотке крови животных III и VI групп на 46 и 69% соответственно; повышением флюоресценции дитиозина в III и VI группах на 70%, а в IV и V группах на 47 и 32% соответственно; и снижением флюоресценции триптофана в III, V и VI группах экспериментальных животных более чем на 25%. При этом, несмотря на то, что интенсивность флюоресценции Лиз-ПОЛ может служить интегральным показателем окислительной модификации как белков, так и липидов, так как в образовании сшивок участвуют соединения обоих классов [9], достоверное повышение уровня данного продукта СРО наблюдалось только в III группе животных, что может свидетельствовать о равнозначности вероятности окислительной модификации как липидов, так и белков при длительном употреблении воды, содержащей соли железа в концентрации 6 мг/л и, по-видимому, выше.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об активации процессов свободно-радикального окисления в организме животных на фоне избыточного поступления в организм солей исследуемых d-металлов. Следует отметить,

Таблица 1. Содержание маркеров перекисного окисления липидов и белков в сыворотке крови крыс при хроническом поступлении солей Fe^{2+} и Cu^{2+}

Группа	Металл (мг/л)	ТБК-РС мкмоль/мкг белка	КС мкмоль/мкг белка	Триптофан ЕФ/50 мкл сыворотки	Дитиозин ЕФ/50 мкл сыворотки	Лиз-ПОЛ ЕФ/50 мкл сыворотки
I	—	$0,18 \pm 0,01$	$11,96 \pm 1,81$	$196,90 \pm 10,29$	$1,46 \pm 0,11$	$0,67 \pm 0,04$
II	$\text{Fe}^{2+}/3$	$0,24 \pm 0,03$	$12,62 \pm 1,33$	$195,14 \pm 12,23$	$1,61 \pm 0,20$	$0,70 \pm 0,14$
III	$\text{Fe}^{2+}/6$	$0,34 \pm 0,05^*$	$17,49 \pm 2,05^*$	$152,21 \pm 12,75^*$	$2,51 \pm 0,37^*$	$0,83 \pm 0,02^*$
IV	$\text{Cu}^{2+}/4,88$	$0,18 \pm 0,01$	$12,25 \pm 2,16$	$173,93 \pm 10,32$	$2,16 \pm 0,07^*$	$0,75 \pm 0,13$
V	$\text{Cu}^{2+}/9,76$	$0,20 \pm 0,02$	$12,02 \pm 2,76$	$133,25 \pm 8,64^*$	$1,94 \pm 0,22^*$	$0,70 \pm 0,12$
VI	$\text{Fe}^{2+}/\text{Cu}^{2+}/3+4,88$	$0,24 \pm 0,02^*$	$20,17 \pm 3,18^*$	$161,86 \pm 24,55^*$	$2,48 \pm 0,36^*$	$0,72 \pm 0,02$

Примечание: * – достоверность отличия от контроля ($p < 0,05$)

что при изолированном поступлении металлов, для сульфата железа более выражено липопероксидное действие, а для сульфата меди – окислительная модификация белков. Учитывая природу исследуемых металлов, основой механизма их прооксидантного действия является способность к восстановлению соединений кислорода в реакциях Фентона [12] и Хабера-Вайса [13]. Образующиеся при этом АФК инициируют процессы ПОЛ и окислительной деградации белков [14]. При этом факт протеотропности солей меди с точки зрения окислительной модификации белков [15] является, по-видимому, следствием не только прооксидантных свойств данного элемента, но и способности к связыванию с функциональными группами боковых радикалов аминокислот, в частности с их цистеиновыми остатками [16]. Данный процесс локализует катионы меди на поверхности белковой молекулы, где, соответственно, и реализуется их прооксидантное действие, сопровождающееся окислением соседних аминокислотных остатков.

Необходимо отметить также и более интенсивное прооксидантное действие комбинации $\text{FeSO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ и CuSO_4 в концентрациях 3 и 4,88 мг/л соответственно по сравнению с изолированным действием металлов в тех же

дозах. Поскольку подобное потенцирующее действие реализуется как в отношении липидов, так и белков, длительное комбинированное воздействие солей Fe^{2+} и Cu^{2+} , даже в дозах превышающих физиологические нормы, существенно повышает риск развития патологических процессов. К подобному эффекту может приводить как сочетание более выраженного липооксидантного действия железа и белоксвязывающей и протеооксидативной способности меди, а также взаимодействие на уровне всасывания в тонкой кишке, приводящее к повышенному всасыванию обоих элементов при их комбинированном поступлении [17].

Заключение

Таким образом, результаты проведенного исследования показали, что длительное избыточное поступление меди и железа с питьевой водой способствует активации процессов свободно-радикального окисления в организме. В то же время наблюдаемые эффекты характеризовались дозозависимостью только в случае употребления железа, а комбинированное поступление данных металлов с питьевой водой взаимно потенцировало прооксидантное действие солей меди и железа.

11.05.2012

Список литературы:

1. Авцын, А.П. Микроэлементозы человека: этиология, классификация, органопатология / А.П. Авцын, А.А. Жаворонков, М.А. Риш, Л.С. Строчкова. – М., 1991. – 496 с.
2. Боев, В.М. Микроэлементы и доказательная медицина / В.М. Боев. – М., 2005. – 208 с.
3. Valko M., Leibfriz D., Moncol J., Cronin M.T., Mazur M., Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease // J. Biochem Cell Biol. 39 (1): 44–84, 2007.
4. Sies, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. ExpPhysiol 82: 291–295, 1997.
5. Aruoma, O.I. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease // Journal of the American Oil Chemists' Society 75(2): 199–212, 1998.
6. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction // Anal Biochem. 95(2): 351–358, 1979.
7. Levine R.L., Garland D., Oliver C.N., Amici A., Climent I., Lenz A.G., Ahn B.W., Shaltiel S., Stadtman E.R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins // Methods Enzymol. 186: 464–78, 1990.
8. Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А., Порохов Г.Е. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека // Вопр. мед. химии. – 1995. – №1. – С. 24–26.
9. Giulivi C., Davies K.J. Dityrosine: a marker for oxidatively modified proteins and selective proteolysis // Methods Enzymol 233: 363–71, 1994.
10. Dousset N., Ferretti G., Taus M., Valdiguié P., Curatola G. Fluorescence analysis of lipoprotein peroxidation // Methods Enzymol 233: 459–69, 1994.
11. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein Measurement with the folin phenol reagent // J Biol Chem 193(1): 265–275, 1951.
12. Fenton, H. J. H. Oxidation of tartaric acid in the presence of iron // J. Chem. Soc 65: 899–910, 1894.
13. Haber F., Weiss J.J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts // Proc. R. Soc. London Ser. A. – 1934. – V. 147. – P. 332–351.
14. Valko M., Morris H., Kronin M.T.D. Metals, toxicity and oxidative stress // Cur Med Chem 12(10): 1161–1208, 2005.
15. Kato Y., Kitamoto N., Kawai Y., Osawa T. The hydrogen peroxide/copper ion system, but not other metal-catalyzed oxidation systems, produces protein-bound dityrosine // Free Radic Biol Med. 31(5): 624–32, 2001.
16. Letelier M.E., Sanchez-Jofre S., Peredo-Silva L., Cortes-Troncoso J., Aracena-Parks P. (2010) Mechanisms underlying iron and copper ions toxicity in biological systems: Pro-oxidant activity and protein-binding effects // Chem Biol Interact. 188(1): 220–7, 2010.
17. Han O., Wessling-Resnick M. Copper repletion enhances apical iron uptake and transepithelial iron transport by Caco-2 cells. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 282: 527–533, 2002.

Сведения об авторах:

Тиньков Алексей Алексеевич, студент Оренбургской государственной медицинской академии,
e-mail: tinkov.a.a@gmail.com

Рогачева Маргарита Николаевна, студент Оренбургской государственной медицинской академии,
e-mail: margarita-rokachova@rambler.ru

Никоноров Александр Александрович, заведующий кафедрой биохимии Оренбургской
государственной медицинской академии, доктор медицинских наук, профессор
460014, г. Оренбург, ул. Советская, 6, e-mail: nikonorov_all@mail.ru

UDC 577.1

Tinkov A. A., Rogachova M. N., Nikonorov A. A.

Orenburg state medical academy, e-mail: tinkov.a.a@gmail.com

CHRONIC CONSUMPTION OF IRON AND COPPER SALTS WITH DRINKING WATER INDUCES OXIDATIVE DAMAGE OF SERUM PROTEINS AND LIPIDS

In the current experiment on female Wistar rats the influence of inorganic salts of Fe and Cu on intensity of free radical oxidation was studied. It is shown that consumption of Fe and Cu with drinking water in doses which exceed maximum permissible concentration 2- and 4-fold for three months induces free radical oxidation processes leading to cumulation of lipid peroxidation (TBARS) and protein oxidation (carbonyls and fluorescent amino acids) products. It is estimated that prooxidant action of isolated iron salts is more potent than in case of copper salts, while the combined consumption of copper and iron is more effective in inducing free radical oxidation than isolated metals.

Key words: iron, copper, free-radical oxidation.

Bibliography:

1. Avtsin, A.P. Human Microelementosis: aetiology, classification, organopathology / A.P. Avtsin, A.A. Zhavoronkov, M.A. Rish, L.S. Strochkova. – Moscow, 1991. – 496 p.
2. Boev, V.M. Microelements and evidence-based medicine / V.M. Boev. – Moscow, 2005. – 208 p.
3. Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T., Mazur M., Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease // J. Biochem Cell Biol. 39 (1): 44–84, 2007.
4. Sies, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. ExpPhysiol 82: 291–295, 1997.
5. Aruoma, O.I. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease // Journal of the American Oil Chemists' Society 75(2): 199–212, 1998.
6. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction // Anal Biochem. 95(2): 351–358, 1979.
7. Levine R.L., Garland D., Oliver C.N., Amici A., Climent I., Lenz A.G., Ahn B.W., Shaltiel S., Stadtman E.R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins // Methods Enzymol. 186: 464–78, 1990.
8. Dubinina Ye.Ye., Burmistrov S.O., Khodov D.A., Porotov G.Ye. Oxidative modification of proteins of human serum // Questions med. chemistry. – 1995. – №1. – P. 24–26.
9. Giulivi C., Davies K.J. Dityrosine: a marker for oxidatively modified proteins and selective proteolysis // Methods Enzymol 233: 363–71, 1994.
10. Dousset N., Ferretti G., Taus M., Valdiguie P., Curatola G. Fluorescence analysis of lipoprotein peroxidation // Methods Enzymol 233: 459–69, 1994.
11. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein Measurement with the folin phenol reagent // J BiolChem 193(1): 265–275, 1951.
12. Fenton, H. J. H. Oxidation of tartaric acid in the presence of iron // J. Chem. Soc 65: 899–910, 1894.
13. Haber F., Weiss J.J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts // Proc. R. Soc. London Ser. A. – 1934. – V. 147. – P. 332–351.
14. Valko M., Morris H., Cronin M.T.D. Metals, toxicity and oxidative stress // Cur Med Chem 12(10): 1161–1208, 2005.
15. Kato Y., Kitamoto N., Kawai Y., Osawa T. The hydrogen peroxide/copper ion system, but not other metal-catalyzed oxidation systems, produces protein-bound dityrosine // Free RadicBiol Med. 31(5): 624–32, 2001.
16. Letelier M.E., Sanchez-Jofre S., Peredo-Silva L., Cortes-Troncoso J., Aracena-Parks P. (2010) Mechanisms underlying iron and copper ions toxicity in biological systems: Pro-oxidant activity and protein-binding effects // ChemBiol Interact. 188(1): 220–7, 2010.
17. Han O., Wessling-Resnick M. Copper repletion enhances apical iron uptake and transepithelial iron transport by Caco-2 cells. Am J PhysiolGastrointest Liver Physiol 282: 527–533, 2002.