

УДК 615.917:576.385

Л. Сутуева, А. Ондасынова, М. Суворова, Б. Абдуллаева, Т. Шалахметова*

Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Республика Казахстан, г. Алматы

*E-mail: Shalakhmetova_t@kazsu.kz

**Экспериментальное исследование биохимических маркеров
гепатотоксического действия Мангистауской нефти**

Статья посвящена изучению влияния нативной нефти на лабораторных крыс в эксперименте для выявления биохимических маркеров её токсического действия. Установлено, что экспериментальная интоксикация крыс сырой нефтью (месторождение Каракудук) в течение 8 суток приводит к немедленной индукции ферментов биотрансформации и сопровождается усилением процессов перекисного окисления липидов.

Ключевые слова: крысы, сырая нефть, интоксикация, детоксикация, антиоксидантная система.

Л. Сутуева, А. Ондасынова, М. Суворова, Б. Абдуллаева, Т. Шалахметова

**Маңғыстау мұнайына гепатотоксикалық әсердің биохимиялық көрсеткіштерін
эксперименттік зерттеу**

Мақалада тәжірибелік егеуқұйрықтың эксперименттік жағдайда биохимиялық мәліметтер алу барысында мұнайдың токсикалық әсері зерттелген. Эксперимент нәтижесінде егеуқұйрық шикі мұнаймен (Қаракұдықтағы) 8 тәулікте аздап биотасымалдау ферменттерінің біршама индукцияға ұшырауы жүреді және липидтердің тотығуы процесіне әкеледі.

Түйін сөздер: егеуқұйрық, шикі мұнай, улану, детоксикация, антиоксиданттық жүйе.

L. Sutuyeva, A. Ondasynova, M. Suvorova, B. Abdullayeva, T. Shalakhmetova

Experimental study of biochemical markers of Mangystau oil' hepatotoxic action

The article is dedicated to investigation of crude oil experimental exposure of rats to reveal the biochemical markers of those xenobiotic toxic action. It was established, that experimental exposure of rats to crude oil (Karakuduk oil field) for 8 days leads to immediate induction of detoxication enzymes accompanied by increased lipid peroxidation in rats liver.

Keywords: rats, crude oil, intoxication, detoxication, antioxidant system.

Ежегодно в окружающую среду выбрасывается огромное количество загрязняющих веществ. Особое внимание уделяется загрязнению среды нефтью и тяжелыми металлами, так как они плохо подвергаются химической и биологической деградации, а в повышенных концентрациях оказывают пагубное влияние на водные и наземные экосистемы. Загрязнение почвы, многочисленные нефтяные амбары и скважины на побережье, отсутствие на предприятиях нефтедобычи эффективной системы утилизации сточных вод,

а также танкерный флот являются главными источниками нефтяного загрязнения [1]. Для оценки биологических эффектов нефтяного загрязнения необходимо знать основные механизмы токсичности нефти и биологические маркеры нефтезагрязнения. Подобная оценка осложняется тем, что химический состав нефти варьирует в зависимости от месторождения и сама нефть представляет собой сложную смесь углеводородов, большинство которых обладает собственной токсичностью. Поступление ксенобиотиков

в организм млекопитающих сопровождается активацией системы детоксикации в печени, которая направлена на биохимическое превращение гидрофобных веществ в гидрофильные через реакции гидроксилирования (цитохром р450) и последующее связывание метаболитов с конъюгатами (например, глутатионтрансфераза и глутатион) или элиминацию с почками и желчью [2]. В некоторых случаях гидроксилирование цитохромом р450 сопровождается токсификацией, то есть усилением токсичности вещества. Кроме того, избыточная активность цитохрома р450 нередко сопровождается образованием свободных радикалов и активных форм кислорода, провоцируя или усиливая окислительный стресс в печени. Исследование процессов детоксикации и уровня антиоксидантной защиты тканей позволит не только выявить механизмы токсичности нефти, но и определить биохимические маркеры повреждения печени и почек при действии изучаемого ксенобиотика. Целью данного исследования, таким образом, явилось изучение влияния нативной нефти на грызунов в эксперименте для выявления биохимических маркеров токсического действия ксенобиотиков.

Материалы и методы исследования

Исследования проводились на белых беспородных крысах, самцах, массой 200 – 250 г. Крысы содержались в условиях вивария, в вентилируемых клетках, при комнатной температуре и получали стандартный рацион питания и воду *ad libitum*. Сырая нефть (месторождение Каракудук) вводилась крысам внутривентрально. Животные были разделены на 14 групп: 1 – контрольные животные; 2 – получали сырую нефть в дозе 0,75 мл/кг м.т. в течение 8 суток; 3 – получали сырую нефть в дозе 1,5 мл/кг м.т. в течение 8 суток; 3 – получали сырую нефть в дозе 3,0 мл/кг м.т. в течение 8 суток. Забой животных проводили под эфирным наркозом. Образцы печени немедленно перфузировали охлажденным буферным раствором. Для получения гомогената тканей кусочки печени и почек измельчали на льду и гомогенизировали в 10 объемах ледяного 0,1 М фосфатно-солевого буфера с помощью гомогенизатора Potter-Elvehjem, затем центрифугировали при 6000 в течение 40 минут, супернатант отбирали и хранили при -70°C до последующего анализа. Содержание малонового диальдегида определяли в супернатанте гомогената печени, используя метод с тиобарбитуровой кислотой

[3]. Определение активности глутатион-S-трансферазы (GST) проводили согласно протоколу для определения активности GST (набор Cayman Technologies) [4]. Для изоляции микросом использовали модифицированный метод Шенкмана и Цинти [5]. Для дальнейшего исследования полученную фракцию микросом сохраняли при температуре -70°C ((Plarinum 500 V, Angelantony Industrie). Содержание цитохрома Р450 определяли по методу Омуре и Сато. Активность супероксиддисмутазы в печени определяли на основании количественного измерения красного формазана, который образуется в результате восстановления нитросинеготетразолия и супероксидных радикалов генерируемых ксантиноксидазой. 50% ингибирования этой системы соответствуют 1 условной единице активности данного фермента [6]. Результаты количественных исследований подвергались статистической обработке. Во всех случаях определяли средние значения и ошибку средней величины. Достоверность различий средних величин оценивали, используя t-критерий Стьюдента. Различия считались достоверными при доверительной вероятности равной 0,95.

Результаты исследований и их обсуждение

Химически нефть представляет собой сложную смесь ароматических и алифатических углеводородов, состав её варьирует в зависимости от месторождения. Поступление сырой нефти в организм млекопитающих возможно с загрязненной водой и пищей, через контакт с кожей и ингаляционно [7]. Поскольку нефть представляет собой сложную смесь веществ, данные относительно абсорбции, распределения, метаболизма и детоксикации нефти ограничены. Большинство компонентов нефти при контакте со слизистой довольно быстро про-никают в кровоток. Компоненты сырой нефти довольно токсичны и обладают системными и тератогенным эффектами [7]. Некоторые компоненты нефти обладают способностью к аккумуляции в гидробионтах и могут передаваться по пищевым цепям. Для изучения влияния нативной нефти на млекопитающих и выявления маркеров токсического действия ксенобиотиков нами был проведен ряд острых экспериментов на лабораторных крысах. Животные, отобранные для контрольных групп, в течение всего эксперимента сохраняли хороший аппетит, адекватное поведение, шерсть оставалась чистой и блестящей. При недельной

интоксикации сырой нефтью у животных не наблюдалось выраженных признаков интоксикации, за исключением несколько заторможенной реакции.

Печень является центральным органом детоксикации, осуществляя энзиматическое превращение жирорастворимых экзогенных или эндогенных соединений в полярные водорастворимые метаболиты, легко выводимые из организма. Нередко промежуточные продукты биотрансформации могут быть более токсичными, обладать более выраженной мутагенной, канцерогенной и даже тератогенной активностью, чем исходные соединения. Прежде всего, в печени крыс определяли маркерные ферменты детоксикации – цитохром р450, осуществляющий гидроксилирование ксенобиотиков, и глутатион-трансферазу – фермент конъюгации. Важным свойством цитохрома р450 является способность к индукции под действием внешних стимулов, в роли которых могут выступать различные факторы окружающей среды, особенно химические вещества [9]. Увеличение содержания и/или активности ферментов биотрансформации может служить индикатором химического воздействия на организм. Более того, избыточная активность цитохрома р450 сопровождается усилением процессов перекисного окисления липидов и наравне с токсификацией ксенобиотиков является механизмом цитотоксического действия многих токсических веществ. На рисунке 1-А представлены результаты определения содержания общего цитохрома р450, а на рисунке 1-Б – результаты определения активности глутатион-S-трансферазы в печени крыс, получавших сырую

нефть внутривентриально в течение недели в дозах 0,75, 1,5 и 3,0 мл/кг массы тела.

Глутатион-трансфераза использует восстановленный глутатион для трансформации ксенобиотиков, участвуя, таким образом, в процессах конъюгации. Усиление активации глутатион-трансферазы увеличивает способность организма приспосабливаться к возрастающему загрязнению внешней среды. Активность глутатион-S-трансферазы достоверно повышалась на 1 сутки воздействия при всех исследуемых концентрациях, при этом четко прослеживается дозозависимый эффект индукции фермента при введении сырой нефти.

Введение крысам сырой нефти в дозе 0,75 мл/кг массы тела приводит к заметной индукции цитохрома р450 в печени на 1 и 3 дни введения (в 1,8 и 1,5 раз, соответственно, $p \leq 0,0001$). В последующие пять дней воздействия уровень цитохрома р450 возвращается к контрольному, несмотря на введение токсиканта. При увеличении дозы сырой нефти до 1,5 мл/кг массы тела уровень цитохрома р450 сходным образом увеличивается на 1 и 3 сутки и достоверно не отличается от контроля на 5 и 8 сутки воздействия. Введение сырой нефти в организм крыс приводит, таким образом, к немедленной индукции ключевого фермента биотрансформации. Химически нефть представляет сложную смесь различных углеводородов, и вероятно, все они в той или иной степени ответственны за индукцию фермента. Наиболее опасные ароматические фракции нефти, доказано, метаболизируются системой цитохрома р450 с образованием токсичных метаболитов и свободных радикалов [10]. Образовавшиеся в процессе биотрансформации гидроперекиси и активные формы кислорода

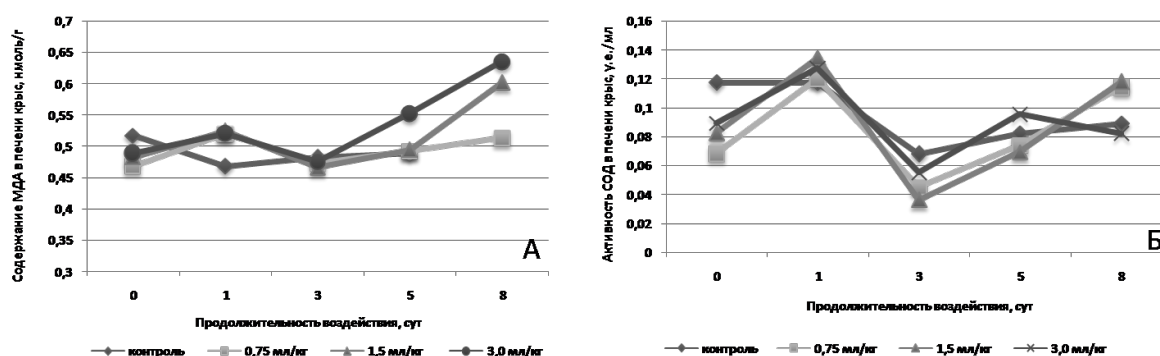


Рисунок 1 – Уровень общего цитохрома р450 (А) и активность глутатионтрансферазы (Б) в печени крыс при многократном в/б введении сырой нефти в течение 8 суток, $M \pm m$

повреждают, в первую очередь, мембраны ЭПР гепатоцитов, несущих мембранные ферменты детоксикации, что, вероятно, и является причиной снижения уровня цитохрома р450 при непрерывном введении сырой нефти.

Активация процессов ПОЛ является неспецифическим механизмом токсического действия большинства ксенобиотиков. В результате появления в гидрофобном слое мембран гидрофильных зон за счёт образования гидропероксидов жирных кислот в клетки могут проникать вода, ионы натрия, кальция, что приводит к набуханию клеток, органелл и их разрушению. Избыточное переокисление мембран вызывает повреждение и мембраносвязанных белков. Поврежденные мембраны утрачивают энергетический потенциал, электровозбудимую функцию, контроль за ионными потоками и медиаторными системами, возникают патологические (воспалительные, нейродегенеративные, злокачественные) изменения в тканях, что, в конце концов, приводит ткань к гибели. Усиление каталитической активности монооксигеназ также может сопровождаться активацией окислительного стресса. Определение уровня продуктов ПОЛ играет исключительную роль в оценке повреждений в клетке.

Степень ПОЛ можно определить по содержанию в тканях продукта переокисления липидов – малонового диальдегида (МДА). Результаты определения уровня МДА в печени и почках крыс при кратковременном введении крысам сырой нефти в дозах 0,75, 1,5 и 3,0 мл/кг массы тела представлены на рисунке 2-А. Достоверное превышения уровня МДА в печени по сравнению с контролем наблюдалось в концентрациях 0,75 и

1,5 мл/кг массы тела только на 5 ($p \leq 0,001$) и 8 сутки введения нефти ($p \leq 0,001$). Введение нефти в дозе 3,0 мл/кг массы тела приводит к достоверному повышению уровня МДА, начиная с 3 дня воздействия.

Повреждающему действию свободных радикалов и активных форм кислорода противостоит система антиоксидантной защиты клеток, представленная антиоксидантами и ферментами. Основной линией антиоксидантной защиты является активация антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы и каталазы. Нами была изучена активность главного антиоксидантного фермента – супероксиддисмутазы (СОД) в печени крыс, подвергнутых кратковременному воздействию сырой нефти. Результаты биохимического исследования активности СОД в печени крыс при кратковременном введении сырой нефти многократно в дозах 0,75, 1,5 и 3,0 мл/кг веса тела представлены на рисунке 2-Б. Во всех исследуемых концентрациях после кратковременного повышения активности, на 3 сутки воздействия наблюдается достоверное снижение активности СОД во всех изучаемых концентрациях, затем активность фермента возвращается к норме и на 8 сутки даже несколько превышает контрольное значение.

Печень как центральный орган биотрансформации ксенобиотиков наиболее подвержена действию самих веществ и их метаболитов. В большинстве случаев гибель гепатоцитов обусловлена нарушением целостности клеточных мембран в результате повреждающего действия свободных радикалов. Последние при интоксикации нефтью появляются в результате метаболизма алифатических и ароматических углеводо-

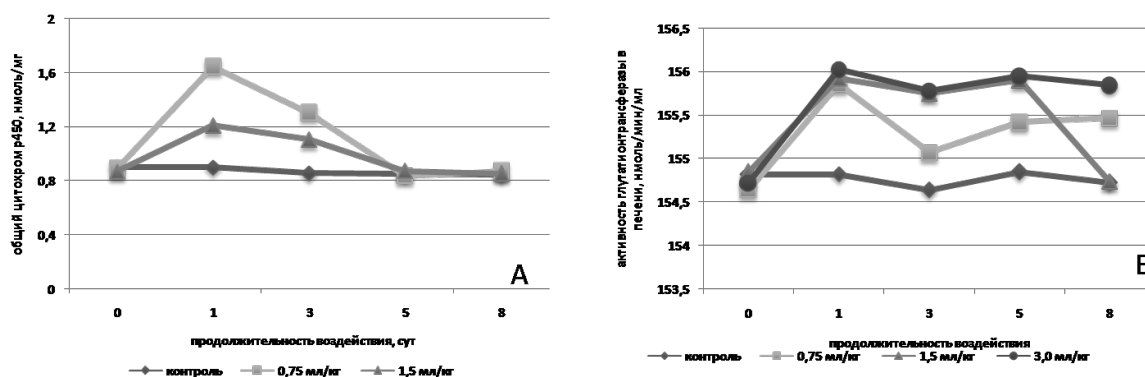


Рисунок 2 – Содержание МДА (А) и активность супероксиддисмутазы (Б) в печени крыс при многократном в/б введении сырой нефти в течение 8 суток, $M \pm m$

родов нефти [11]. Бензены и полициклические ароматические углеводороды являются одними из наиболее токсичных компонентов нефти, обладая также мутагенным и канцерогенным свойствами. Сходные результаты по активации процессов ПОЛ и угнетению антиоксидантных ферментов при экспозиции крыс сырой нефтью наблюдались при исследованиях и на других грызунах и в других концентрациях [12, 13].

По результатам наших исследований, экспериментальная интоксикация крыс сырой

нефтью (месторождение Каракудук) в течение 8 суток приводит к немедленной индукции ферментов биотрансформации – цитохрома р450 и глутатионтрансферазы. При кратковременном введении сырой нефти в печени крыс определяется повышенная концентрация продукта ПОЛ – малонового диальдегида. Усиление процессов ПОЛ сопровождается угнетением активности антиоксидантных ферментов в печени крыс при введении сырой нефти.

Литература

- 1 Tolosa I., Mora S., Reza S. M., Villeneuve J. P., Bartocci J., Cattini C. Aliphatic and aromatic hydrocarbons in coastal caspian Sea sediments // *Marine Pollution Bulletin*. - 2004. - V. 48, № 1-2. - P. 44-60.
- 2 Mansuy D. The great diversity of reactions catalyzed by cytochromes P450 // *Comp. Biochem. Physiol. C*. - 1998. - Vol.121. - P. 5-14.
- 3 Стальная И.Д., Гаришвили Г.Г. Определение МДА с помощью тиобарбитуровой кислоты // В сб.: *Современные методы в биохимии*. - 1977. №3. - С. 66-68.
- 4 Herbig W.J., Pabst M.J., Jacoby W.B. Glutathione S-transferase, the first enzymatic step in mercapturic acid formation // *J. Biol. Chem.* -1974. № 249. - P. 7139-7147.
- 5 Pradnya S., Walawalkar, Pooja S., Serai, Iyer K.R. Isolation and catalytic competence of different animal liver microsomal fractions prepared by calcium-aggregation method // *Indian journal of pharmaceutical sciences*. - 2006. - V. 68, № 1. 2. - P. 262-265.
- 6 Guengerich F.P. Analysis and characterization of enzymes. In: *Principles and methods of toxicology*, Hayes A.W (eds). 3rd Edn., Raven Press, New York. - 1994. - P. 1259-1313.
- 7 International Agency for Research on Cancer (IARC). Monographs. Occupational Exposures in Petroleum Refining; Crude Oil and Major Petroleum Fuels, 1989, Vol.45.
- 8 Deer A.K., Henczova M., Banka L., Varanka Z., Nemcsok J. Effects of crude oil and oil fractions on the liver P450-dependent monooxygenase activities and antioxidant defence system of different freshwater fish species // *Acta. Biol. Hung.* - 2010. - Vol.61. - P. 262-273.
- 9 Achuba F.I., Osakwe S.A. Petroleum induced free radical toxicity in African catfish (*Clarias gariepinus*) // *Fish Physiol. Biochem.* - 2003. - Vol.29. - P. 97-103.
- 10 Adedara I.A., Teberen R., Ebokaiwe A.P., Ehwerhemuepha T., Farombi E.O. Induction of oxidative stress in liver and kidney of rats exposed to Nigerian bonny light crude oil // *Environ. Toxicol.* - 2011. - Doi: 10.1002/tox.20660.
- 11 Gad N.S. Oxidative stress and antioxidant enzymes in *Oreochromis niloticus* as biomarkers of exposure to crude oil pollution // *IJESE*. - 2011. - Vol.1. - P. 49-58.
- 12 Mahmoud K., Shalakhmetova T., Deraz Sh et al. Changes in hepatic antioxidant defense system with liver injury development in rats with crude oil intoxication // *J.Biol.Chem.Environ.Sci.* -2011. - vol6., N4.-P.483 - 500.