

**ВПЛИВ ІОНІВ ЗАЛІЗА (II) НА ПОКАЗНИКИ ОКСИДАТИВНОГО
СТРЕСУ Й АКТИВНІСТЬ АНТИОКСИДАНТНИХ ФЕРМЕНТІВ У
ДАФНІЙ *DAPHNIA MAGNA***

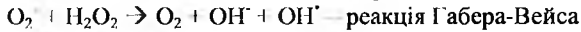
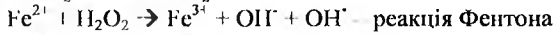
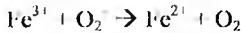
Досліджено вплив іонів заліза на оксидативний стрес у дафнії. Виявлено, що надлишок іонів Fe^{2+} викликає оксидативний стрес у дафнії *D. magna*. Оксидативний стрес зумовлює падіння концентрації сульфгідрильних груп, зростання вмісту ТБКАП і КБ, які є індикаторами стресу. Низькомолекулярні тіолові групи, будучи антиоксидантами, захищають білкові тіоли від окислення шляхом глутатіонізації або відновлюють дисульфідні групи білків. Активність СОД була зниженою протягом усього експерименту, ймовірно, внаслідок дії АФК. Активність іншого антиоксидантного ферменту каталази після значного зниження у перші години інкубації відновилась до вихідного рівня, вірогідно, внаслідок синтезу нових молекул ферменту.

Ключові слова: оксидативний стрес, дафнії.

Вступ

У зв'язку з різким погіршенням стану навколишнього середовища особливої актуальності набувають токсикологічні дослідження. Зважаючи на високий вміст у побутових та промислових відходах, стоках, вихлопних газах токсичних важких металів (свинцю, заліза, ртуті тощо), важливим є вивчення впливу важких металів на живий організм [3].

Відомо, що токсичність іонів заліза зумовлена впливом на окисно-відновний статус клітини [5; 7; 8]. Надлишок іонів заліза в клітині може бути причиною посиленої генерації активованих форм кисню (АФК), таких як супероксиданіон (O_2^-), пероксид водню (H_2O_2) і гідроксильний радикал (OH^\cdot). Генетичні й біохімічні дослідження доводять, що вільнорадикальні форми кисню відіграють ключову роль у загальних механізмах старіння у багатьох видів тварин [5]. Обмін речовин, вплив тих чи інших факторів зовнішнього середовища на метаболізм, а також вікові зміни балансу між прооксидантними й антиоксидантними процесами зручно здійснювати на представниках зоопланктону – дафніях (*Daphnia magna*) [1]. Дослідження вмісту таких показників оксидативного стресу, як тіобарбітурат-активні продукти (ТБКАП), тіолові групи й білкові карбоніли, дозволяє проаналізувати вплив тих чи інших факторів на білкові макромолекули та ліпідні комплекси. Одним із таких чинників є тривала дія іонів заліза. Давно відомо, що здатність H_2O_2 окислювати органічні сполуки значно підвищується у присутності солей заліза. Суміш солей заліза з пероксидом водню називають реактивом Фентона, і він широко використовується як гідроксилюючий агент. У ході взаємодії АФК з іонами заліза відбуваються такі процеси [7]:



Антиоксидантні ферменти є важливими захисними механізмами проти дії АФК. Їхня відповідь і ефективність відрізняється в залежності від виду тварин. Дисмутазна реакція O_2^- з водою з утворенням H_2O_2 відбувається або спонтанно, або за участю супероксиддисмутази (СОД). Ефективність супероксиддисмутази дуже велика [7]. З усіх компонентів клітини тільки закис азоту (NO) вступає у реакцію з O_2^- швидше, ніж супероксиддисмутази. При низькій концентрації NO у клітинах супероксид, як правило, руйнується за участю СОД, не встигаючи вступити в інші хімічні реакції [7]. Тому накопичення H_2O_2 – головний наслідок утворення O_2^- у клітинах. Утворений пероксид водню знешкоджують ферменти різних класів – каталази, глутатіонпероксидази й тіоредоксинпероксидаза. Наступне відновлення окислених тіолових груп глутатіону й тіоредоксину відбувається у реакціях, які каталізуються відповідними редуказами з участю NADPH [7]. Для захисту клітин від утворення ОН немале значення мають іммобілізація іонів заліза й видалення лабільних гемових груп. Таким чином, дослідження вмісту ТБКАП і тіолових груп, як показників оксидативного стресу, а також активності ілових антиоксидантних ферментів дозволяє виявити вплив тривалої дії іонів заліза на розвиток вільнорадикального дисбалансу.

У зв'язку з цим метою роботи було дослідити вплив іонів заліза протягом різного часу дії на деякі показники окисного пошкодження клітинних компонентів і активність головних антиоксидантних ферментів – СОД і каталази, а також лактатдегідрогенази – у дафній *Daphnia magna*.

Матеріали й методи

Реактиви, якими користувалися під час дослідження: сульфат заліза, 2-нітро-5-тіобензоат (ДТНБ), тіобарбітурова кислота, бутильований гідрокситолуол, етилендіамінтетраацетат (ЕДТА), кварцетин, NADPH були виробництва Sigma-Aldrich Co. (США), динітрофенілгідразин – кваліфікації “чда”.

Дослідження проводились на чистій культурі дафній *D. magna*, які утримувались в акваріумі. Вода для вирощування дафній бралася водопровідна, відстояна не менше 3-х днів. Дафнії споживали бактерії, які виростили на моркві та шкірках банана. Для постановки експерименту використовували особини дафній приблизно одного віку (10–15 днів, розміром 3–4 мм) для мінімізації біологічних відмінностей.

Після досягнення дафніями відповідного віку їх піддавали дії сульфату заліза (II) протягом 1, 3, 6, 12 і 24 год. Для цього тварин поміщали в посудину об'ємом 1 л, у якій кінцева концентрація FeSO_4 становила 0,020 мМ. Для контролю дафнії витримували протягом того самого часу за тих самих умов без FeSO_4 . Після указаних проміжків часу 25–30 дафній вагою приблизно 200 мг, просушених на фільтрувальному папері, гомогенізували в гомогенізаторі

Поттера-Ельвегейма (1:10, маса:об'єм) у середовищі для гомогенізації, яке містило (вказано кінцеві концентрації): 50 мМ калій-фосфатного буфера, рН 7,0, 0,5 мМ ЕДТА і кілька кристаликів фенілметилсульфонілфториду (інгібітора протеаз). Гомогенат центрифугували в епандорфах 10 хв при 13000 г. Для вимірювання тіолових груп і активностей ферментів відбирали супернатанти.

Число сульфгідрильних груп визначали за допомогою реактиву Елмана [6]. Даний реактив являє собою розчин 1 мМ ДТНБ у 50 мМ Тріс-НСІ буфері, рН=8,0. У ході реакції вивільняється аніон 2-нітро-5-тіобензоату, що поглинає світло при 412 нм. Коефіцієнт молярної екстинції 2-нітро-5-тіобензоату $\epsilon_{412} = 14000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Суміш для визначення вмісту загальних тіолів містила (вказано кінцеві концентрації): 20 мкМ ДТНБ (рН 8,0), 75 мкл супернатанту й воду до об'єму 1,5 мл. Суміші інкубували 30 хв при кімнатній температурі. Контрольна проба містила воду замість супернатанту. Потім вимірювали оптичне поглинання проб при довжині хвилі 412 нм на спектрофотометрі "Specol-221".

Для визначення вмісту низькомолекулярних тіолів до 75 мкл супернатанту додавали 37,5 мкл 10% (кінцева концентрація) трихлороцтової кислоти й центрифугували 10 хв при 5000 г. Отриманий супернатант кількісно переносили у пробірку для інкубації, додавали ДТНБ й доводили об'єм буфером Тріс-НСІ до 1,5 мл. Інкубували 30 хв і вимірювали поглинання при 412 нм.

Вміст високомолекулярних тіолів розраховували за різницею між вмістом загальних і низькомолекулярних сульфгідрильних груп.

Тіобарбітурат-активні продукти (ТБКАП) - це кінцеві низькомолекулярні продукти пероксидного окислення ліпідів, представлені в основному малоновим діальдегідом. Метод їх визначення ґрунтується на утворенні комплексу цих продуктів із тіобарбітуровою кислотою. Визначення цього показника здійснювали за методикою, описаною раніше [2].

Під впливом різного ряду окисників у бічних радикалах амінокислот утворюються додаткові карбонільні групи. Кількісне визначення білкових карбонільних (КБ) ґрунтується на реакції між карбонільними групами й 2,4-динітрофенілгідразином і здійснювалось за методикою, описаною раніше [2].

Визначення активності лактатдегідрогенази (ЛДГ) проводили спектрофотометричним методом. Реакційна суміш містила такі компоненти (вказано кінцеві концентрації): 50 мМ калій-фосфатного буфера (КФБ), рН 7,0, 1 мМ пірувату, 0,5 мМ ЕДТА, 160 мкМ NADH і 5-10 мкл супернатанту. Зміну оптичної густини реєстрували на спектрофотометрі СФ-46 (Ленінград, СРСР) при 340 нм. Активність ферменту виражали у міліюдиницях на міліграм білка.

Швидкість реакції, яка здійснюється каталазою, реєстрували за зміною концентрації пероксиду водню при 240 нм. Реакційна суміш містила: 50 мМ КФБ, рН 7,0, 0,5 мМ ЕДТА, 10 мМ H_2O_2 і 5 мкл супернатанту. Активність каталази розраховували в міжнародних одиницях на міліграм білка.

Активність СОД визначали за інгібуванням швидкості окислення кверцетину. Реакційна суміш містила (вказано кінцеві концентрації): 30 мМ Трис-НСІ буфера (рН 10,0), 0,5 мМ ЕДТА, 0,8 мМ тетраметилетилендіаміну, 0,05 мМ кверцетину і 10–200 мкл супернатанту. Швидкість реакції окислення кверцетину реєстрували на спектрофотометрі “Specol-221” при 406 нм для шести різних об’ємів супернатанту. За одиницю активності СОД приймали кількість ферменту (на мг білка), що інгібує реакцію окислення кверцетину на 50% від максимального інгібування.

У супернатантах визначали концентрацію білка методом Бредфорда для розрахунку специфічної активності ферментів.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою комп’ютерної програми “Mynova”, застосовуючи критерій Стьюдента–Пьюмана–Кьюлза. Для розрахунку констант інгібування використовували програму “Kinetics”. Експериментальні дані представлені як середнє значення і його похибка.

Результати й обговорення

У ході проведеного експерименту за впливом 20 мкМ розчину FeSO_4 протягом різного часу дії на вміст сульфгідрильних груп було отримано такі результати. Експериментальні умови не вплинули на вміст високомолекулярних тіолів у жодній групі (рис. 1).

Вміст низькомолекулярних сульфгідрильних груп знизився уже через 1 год у 4 рази порівняно з контролем (рис.2). При подальшій інкубації цей показник, хоч і проявив тенденцію до зростання, залишався нижчим за контроль.

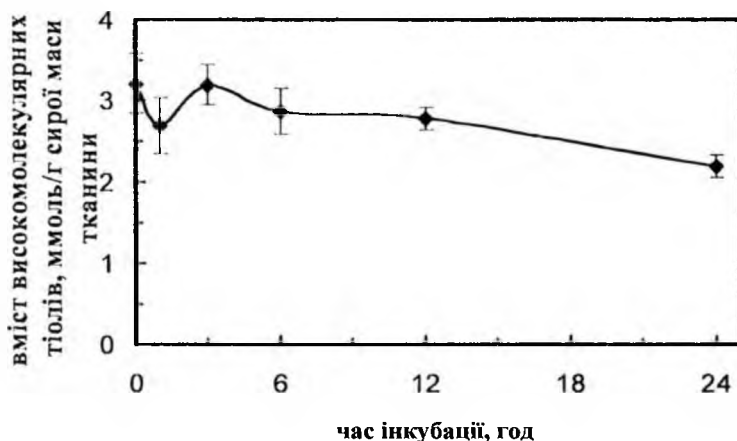


Рис. 1. Вплив 20 мкМ FeSO_4 протягом різного часу дії на вміст високомолекулярних тіолів у дафнії *D. magna*. n = 6.

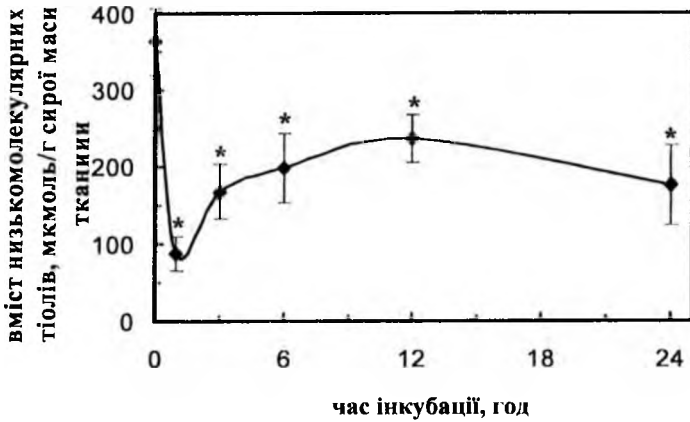


Рис. 2. Вплив 20 мкМ FeSO₄ протягом різного часу дії на вміст низькомолекулярних тіолів у дафній *D. magna*. *Вірогідно відрізняється від контрольного значення (без FeSO₄) з $P < 0,005$, $n = 5$.

Рівень ТБКАП підвищився вже після 1 год інкубації з FeSO₄ в 1,8 раза порівняно з контрольною пробкою і продовжував зростати до 6 год. Після 12 год інкубації вміст ТБКАП почав знижуватись, а через 24 год зменшився на 30% порівняно з максимальним вмістом ТБКАП, відміченим на 6-й годині досліджу (рис. 3).

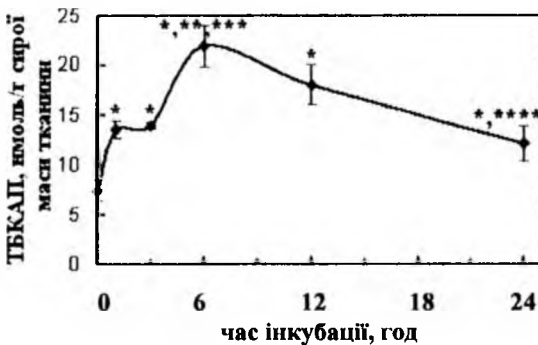


Рис. 3. Вплив 20 мкМ FeSO₄ протягом різного часу дії на вміст ТБК-активних продуктів у дафній *D. magna*. *Вірогідно відрізняється від контрольного значення (без FeSO₄) з $P < 0,005$; **вірогідно відрізняється від дії FeSO₄ протягом 1 год із $P < 0,005$; ***вірогідно відрізняється від дії FeSO₄ протягом 3 год із $P < 0,005$; ****вірогідно відрізняється від дії FeSO₄ протягом 6 год із $P < 0,005$, $n = 6$.

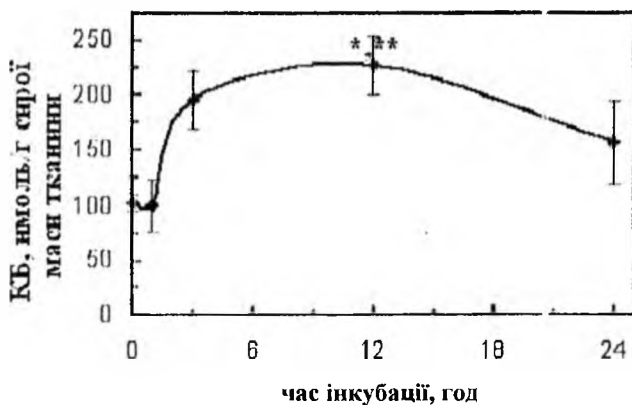


Рис. 4. Вплив 20 мкМ FeSO₄ протягом різного часу дії на вміст білкових карбонілів у дафній *D. magna*. *Вірогідно відрізняється від контрольного значення (без FeSO₄) з $P < 0,005$; **вірогідно відрізняється від дії FeSO₄ протягом 1 год із $P < 0,005$, $n = 5$.

Унаслідок дії FeSO₄ вміст білкових карбонілів (КБ) плавно зростав до 12-ї години інкубації, досягнувши в цій точці значення приблизно у 2 рази вищого за контрольний показник. Після 24-х год інкубації у середовищі з FeSO₄ вміст КБ майже повернувся до вихідного рівня (рис. 4).

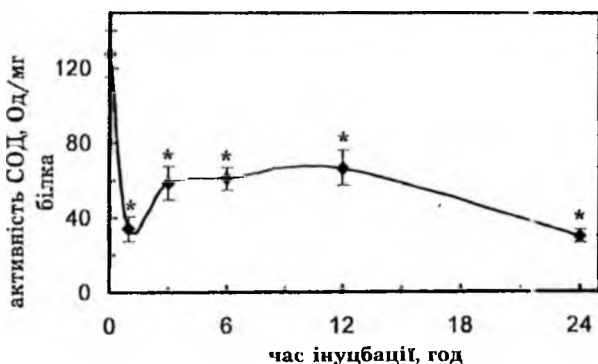


Рис. 5. Вплив 20 мкМ FeSO₄ протягом різного часу дії на активність СОД у дафній *D. magna*. *Вірогідно відрізняється від контрольного значення (без FeSO₄) з $P < 0,005$, $n = 5 - 6$.

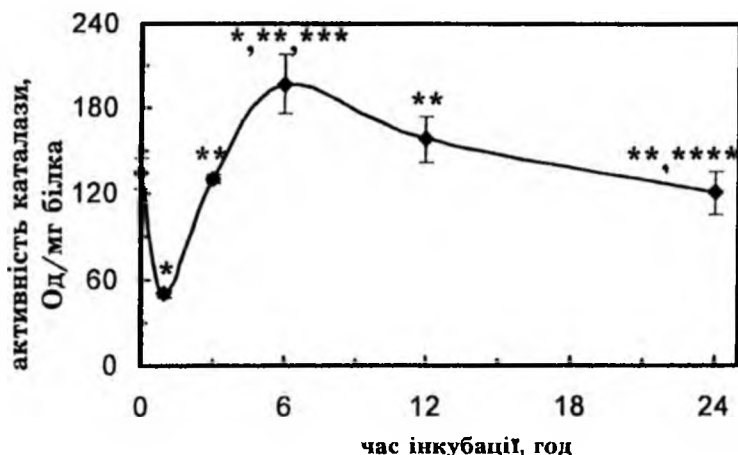


Рис. 6. Вплив 20 мкМ FeSO_4 протягом різного часу дії на активність каталази у дафній *D. magna*. *Вірогідно відрізняється від контрольного значення (без FeSO_4) з $P < 0,005$; **вірогідно відрізняється від дії FeSO_4 протягом 1 год із $P < 0,005$; ***вірогідно відрізняється від дії FeSO_4 протягом 3 год із $P < 0,005$; ****вірогідно відрізняється від дії FeSO_4 протягом 6 год із $P < 0,005$, $n = 5$.

Інкубація з 20 мкМ FeSO_4 вже через 1 годину призвела до зниження активності супероксиддисмутази в 4 рази відносно контролю. Активність залишалася низькою протягом усіх 24 годин експерименту (рис. 5).

Після 1 год перебування дафній у середовищі із залізом спостерігалось зниження активності каталази у 2,5 рази стосовно контролю, але після 3 год активність даного ферменту повернулася до вихідного рівня. На 6 год досліджу активність ферменту зросла в 1,5 рази, після чого почала знижуватись і досягнула контрольного показника на 24 годині (рис. 6).

Схожа ситуація спостерігалась щодо лактатдегідрогенази. Активність ЛДГ знизилась після 1 год у 7 разів стосовно контрольної групи, проте швидко почала підвищуватись. Шість годин експериментальних умов призвели до підвищення активності ЛДГ у 3 рази порівняно з контролем і далі її активність залишалася високою (рис.7).

Отримані результати свідчать, що іони заліза задіяні у розвиток оксидативного стресу. Уже протягом першої години після додавання у середовище 20 мкМ сульфату заліза спостерігається підвищення вмісту ТБКАП та знижується вміст низькомолекулярних тіолів. Подальша інкубація протягом 6–12 год спричиняє найбільший ріст продуктів окислення ліпідів і білків – КБ

і ТБКАН, проте 24 год дії стресового фактора повертає вказані параметри до контрольного рівня. Можна припустити, що дафнії за добу дії даного стресового фактора адаптуються до даних умов, хоча вміст низькомолекулярних тіолів так і не повертається до норми.

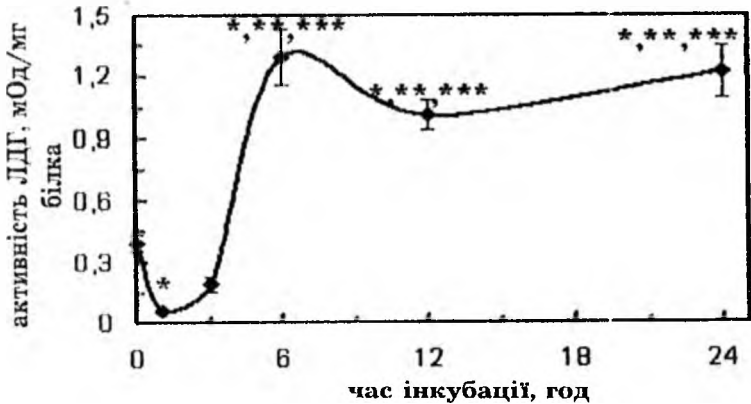


Рис. 7. Вплив 20 мкМ FeSO_4 протягом різного часу дії на активність ЛДГ у дафній *D. magna*. *Вірогідно відрізняється від контрольного значення (без FeSO_4) з $P < 0,005$; **вірогідно відрізняється від дії FeSO_4 протягом 1 год з $P < 0,005$; ***вірогідно відрізняється від дії FeSO_4 протягом 3 год із $P < 0,005$, $n = 5$.

Зниження вмісту низькомолекулярних тіолів зумовлене утворенням дисульфідних мостиків між цистеїнами різних молекул глутатіону при його окисленні [5]. Окислення тіолових груп молекулярним киснем здійснюється через процеси, в ході яких генеруються АФК. Високомолекулярні тіоли представлені сульфгідрильними групами білків. При порушенні окисно-відновних процесів -SH-групи переходять у дисульфіди -S-S- [4]. При тривалому окисдаивному стресі для збереження структури білків може відбуватися білкова глутатіонізація, що призводить до зниження вмісту білкових тіолів. Білкова глутатіонізація – утворення дисульфідного зв'язку між цистеїном білка й цистеїном у -SH [4]. Цей процес слугує для регуляції білкових функцій при зміні окисно-відновного статусу клітини. Той факт, що у наших дослідях вміст білкових сульфгідрильних груп не змінився, тоді як концентрація низькомолекулярних тіолів знизилась, можна пояснити використанням глутатіону на відновлення окислених тіолових груп білків.

Про швидкий розвиток окисдаивного стресу свідчать результати, отримані при вимірюванні антиоксидантних ферментів. Перша година стресових умов спричинила зниження активності СОД, яка так і не відновилась до кінця

експерименту. Очевидно, у цьому випадку проявляється негативна дія АФК на структуру ферменту, внаслідок чого фермент інактивується. Активність каталази також знизилась у перші години дослідних умов, але швидко відновилась, починаючи з 6 год інкубації і залишалась на рівні контрольного значення до кінця досліду. Подібна ситуація спостерігалась і з ЛДГ – фермент втратив активність у перші години експериментальних умов, але після 6 год його активність різко зросла й залишалась такою ж високою й надалі. Висока активність ЛДГ може свідчити про активацію гліколізу за даних умов.

Висновки

1. Надлишок іонів Fe^{2+} викликає оксидативний стрес у дафній *D. magna*. Оксидативний стрес зумовлює падіння концентрації сульфгідрильних груп, зростання вмісту ТБКАП і КБ, які є індикаторами стресу.

2. Низькомолекулярні тіолові групи, будучи антиоксидантами, захищають білкові тіоли від окислення шляхом глутатіонізації або відновлюють дисульфідні групи білків.

3. Активність СОД була зниженою протягом усього експерименту, ймовірно, внаслідок дії АФК. Активність іншого антиоксидантного ферменту – каталази після значного зниження у перші години інкубації відновилась до вихідного рівня, вірогідно, внаслідок синтезу нових молекул ферменту.

1. Константинов А.С. Общая гидробиология – М.: Высш. школа, 1979. – 480 с.
2. Луцак В.І., Багнокова Т.В., Луцак О.В. Показники оксидативного стресу. І. Тіобарбітуратактивні продукти і карбонільні групи білків // Український біохімічний журнал. – 2004. – Т. 76. – № 3. – С. 136–141.
3. Трахтенберг М.М. Тяжелые металлы во внешней среде. Современные гигиенические и токсикологические аспекты. – Минск: Наука и техника, 1994. – 228 с.
4. Casagrande S. Glutathionylation of human thioredoxin: A possible crosstalk between the glutathione and thioredoxin systems // PNAS. – 2002. – V. 99, № 15. – P. 9745–9749.
6. Droge W. Aging-related changes in the thiol/disulfide redox state: implications for the use of thiol antioxidants // Exper. Gerontol. – 2002. – № 37. – P. 1331–1343.
7. Ellman G.L. Tissue sulfhydryl groups // Arch. Biochem. Biophys. – 1959. – № 82. – P. 70–77.
8. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Free Radicals In Biology and Medicine. - Oxford: Clarendon Press, 1999. – 543 p.
9. Tojokuni Sh. Iron-induced carcinogenesis: the role of redox regulation // Free Radic. Biol. Med. – 1996. – V. 20, № 4. – P. 553–566.

Time-dependent effects of Fe(II) on the levels of main indices of oxidative stress and activities of some enzymes have been studied in Daphnia magna. The results demonstrate an increase in the enzyme activities after 3–6 h of stress conditions and an increase in the levels of the thiobarbituric-acid reactive substances, protein carbonyls and protein thiols.

Key words: oxidative stress, Daphnia.