

УДК 57.014:577.125.33:616-092.4

ЗАКОНОМЕРНОСТИ ВЛИЯНИЯ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ В ЛИПИДНОЙ МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЕ

Будкевич Р.О., Демченков Е.Л., Будкевич Е.В.

ФГАОУ ВПО «Северо-Кавказский федеральный университет»,
Ставрополь, e-mail: budkev@mail.ru

В модельных системах с липопротеидами желтка куриных яиц оценивали уровень ТБК-активных продуктов и общую АОА при моделировании загрязнения тяжелыми металлами. В липидной модели оценивали зависимость перекисного окисления липидов от ПДК кадмия и свинца. Образование ТБК-активных продуктов и уровень АОА в модельной системе не зависели от концентрации свинца. Увеличение ПДК кадмия сопровождалось ростом ТБК-активных продуктов. В модельной системе с сырым молоком количество ТБК-активных продуктов выше в пробах, загрязненных кадмием, чем свинцом, независимо от концентрации. При осаждении белков молока, в пробах содержащих свинец, сыворотка проявляла одинаковый уровень АОА при различной концентрации ТМ. В пробах, содержащих кадмий, после осаждения белков уровень АОА снижался с ростом концентрации металла. Употребление крысами в течение 1 месяца питьевой воды с хлоридом кадмия или свинца в дозе 50 ppm выявил рост ТБК-активных продуктов в плазме крови у крыс, получавших раствор хлорида кадмия, в сравнении с животными, получавшими раствор соли свинца.

Ключевые слова: перекисное окисление липидов, ТБК-активные продукты, антиоксидантная активность, кадмий, свинец

REGULARITIES OF HEAVY METALS INFLUENCE ON LIPID PEROXIDATION IN LIPID MODEL SYSTEM

Budkevich R.O., Demchenkov E.L., Budkevich E.V.

FSAEI HPE «North-Caucasus Federal University», Stavropol, e-mail: budkev@mail.ru

TBA-active products and total antioxidant activity (TAA) were estimated in model system of lipoproteins chicken egg yolks in condition of heavy metals contamination. Lipid peroxidation was estimated according to threshold limit value (TLV) of cadmium and lead. TBA-active products formation and level of TAA didn't correlate with lead concentration. Increase of cadmium TLV provoked increase of TBA-active products. Moreover, concentration of TBA-active products in model system with raw milk was higher in samples with cadmium than with lead regardless of the metal concentration. Precipitation of milk protein in the samples with lead showed same level of milk serum TAA regardless metal concentration. Opposite, level of milk serum TAA steadily decrease with the increasing concentration of cadmium after precipitation of milk protein in the samples. Wistar rats were treated drinking water with $CdCl_2$ or $PbCl_2$ in a dose of 50 ppm for 1 month. Increase level of TBA-active products in rats serum was provoked significantly in group treated with cadmium than lead.

Ключевые слова: lipid peroxidation, TBA-active products, antioxidant activity, cadmium, lead

Изменение экологической ситуации трагивает вопросы здоровья и адаптивных возможностей населения различных возрастов [2]. Увеличение патологий обусловлено не только постоянным загрязнением окружающей среды, но и циркуляцией в ней ряда элементов, уже включенных в пищевые цепи, например, тяжелых металлов (ТМ). В ранее проведенных исследованиях выявили превышение допустимого уровня содержания ТМ в сыром молоке ряда населенных пунктов Ставропольского края [3]. Эти элементы, попадая и накапливаясь в организме, являются биохимической основой нарушения ряда функций организма [1, 5]. Одними из первых воздействию ТМ подвергаются липиды как основной элемент живых организмов с образованием продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) [6]. Пищевые продукты, загрязненные ТМ, являются не только источниками поступления в организм ТМ, но и причиной биохимической трансформации продуктов со снижением их качества и накоплением продуктов ПОЛ. Остается открытым вопрос

особенностей влияния тяжелых металлов на ПОЛ.

Целью исследования было выявить закономерности изменения ПОЛ в липидной модельной системе в зависимости от специфичности ТМ и уровня концентрации (ПДК) на примере свинца и кадмия.

Материалы и методы исследования

Основные исследования проводили в модельной системе путем внесения заданной концентрации тяжелых металлов. Для этого использовали суспензию липопротеидов желтка (ЖЛП) куриных яиц, помещенную в среду культивирования с оптимальной величиной pH для проведения реакции перекисного окисления липидов в соответствии с моделью, описанной ранее [4]. Использован подход, описанный Замбрицким О.Н. и соавторами: для приготовления модельной системы из куриного яйца выделяли желток, подсушивали его на фильтровальной бумаге, а затем растворяли в равном объеме фосфатного буфера (40 mM KH_2PO_4 + 105 mM KCl, pH 7,5). Полученную суспензию ЖЛП перед использованием разводили в 25 раз тем же буфером. Суспензию можно хранить при 4°C в течение недели.

Исследования проводили следующим образом: к 0,5 мл образца исследуемого продукта добавляли

1 мл суспензии ЖЛП, затем 3 мл 1% ортофосфорной кислоты (рН 2,0). Перекисное окисление липидов во всех пробах инициировали добавлением 0,1 мл раствора сернистого железа (30 мг $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ в 10 мл дистиллированной воды). Контрольная проба не содержала образцов исследуемого продукта. Пробы тщательно перемешивали и инкубировали в термостате на водяной бане при 37°C в течение 20 мин.

Скорость перекисного окисления липидов определяли по количеству накопившихся ТБК-продуктов (малоновый диальдегид), реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК). Для этого в каждую пробирку после культивирования добавляли по 1 мл 0,6% тиобарбитуровой кислоты. Содержимое пробирок снова перемешивали и помещали на кипящую водяную баню на 20 минут. Далее пробирки охлаждали, добавляли по 4 мл бутанола, тщательно перемешивали и центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин. Оптическую плотность верхней (бутанольной) фазы измеряли при 540 нм с помощью спектрофотометра СФ-46. В качестве контроля использовали чистый бутиловый спирт. Расчет содержания продуктов, реагирующих с ТБК, проводили с учетом коэффициента молярной экстинкции малонового диальдегида, равно $1,56 \cdot 10^5$ моль \cdot см $^{-1}$:

$$A = E_{\text{оп}} \cdot 10^6 \cdot 4 \text{ мл} / 1,56 \cdot 10^5 \cdot 0,5 \text{ мл} = E_{\text{оп}} \cdot 51,3,$$

где A – содержание МДА (в мкмоль/л или нмоль/мл); 4 мл – объем бутанольной фазы; 0,5 мл – объем пробы исследуемого продукта; $E_{\text{оп}}$ – оптическая плотность, измеренная в образцах и контроле.

Антиоксидантную активность (АОА) исследуемого продукта рассчитывали по формуле

$$\text{АОА}(\%) = (E_{\text{контр}} - E_{\text{обр}} / E_{\text{контр}}) \cdot 100,$$

где АОА – антиоксидантная активность исследуемого продукта в (%); $E_{\text{контр}}$ и $E_{\text{обр}}$ – оптическая плотность, измеренная в образцах и контроле.

Оценивали уровень ТБК-активных продуктов с использованием стандартных диагностических наборов (ТБК-Агат, Россия) в соответствии с инструкцией к набору. В отдельных исследованиях содержание АОА контролировали амперометрическим методом на приборе «ЦветЯуза-01-АА» в соответствии с аттестованными методиками (МВИ 31-07 и МВИ 120-08), инструкцией к прибору и ГОСТ Р 54037-2010; ГОСТ Р 54036-2010 (в расчете на галловую кислоту).

При моделировании загрязнения тяжелыми металлами исходили из норм определяемых Федеральным законом от 12.06.2008 № 88-ФЗ «Технический регламент на молоко и молочную продукцию» допустимый уровень содержания в сыром молоке свинца 0,1 мг/л, а кадмия 0,03 мг/л, что соответствует ПДК (предельно допустимая концентрация). В эксперименте рассматривались как предельно допустимые уровни, так и превышение допустимого уровня тяжелых металлов в два и десять раз (Cd – 0,03 мг/л (ПДК); 0,06 мг/л (2 ПДК); 0,3 мг/л (10 ПДК) и Pb – 0,1 мг/л (ПДК); 0,2 мг/л (2 ПДК); 1 мг/л (10 ПДК)). Все эксперименты проведены в 3-кратной повторности.

Для подтверждения специфичности действия ТМ сравнивали действие свинца и кадмия в модели *in vivo*. Исследование проводилось на 21 крысе-самце линии Вистар. Для проведения исследования было сформировано три группы животных: 1-я (контрольная) группа – крысы, получавшие питьевую воду; 2-я и 3-я группы – животные, получавшие 1 месяц питьевую воду с хлоридом кадмия и свинца в дозе 50 ppm

соответственно. Питьевая вода с данными растворами давалась животными *ad libitum*. Кровь забиралась из хвостовой вены через месяц эксперимента под эфирным наркозом. Содержание продуктов перекисного окисления липидов определяли в соответствии с инструкцией набора реактивов «ТБК – Агат». Все результаты обрабатывались с использованием статистических методов в соответствии с типом распределения данных.

Результаты исследования и их обсуждение

В модельном эксперименте добавление различных концентраций тяжелых металлов в инкубационную среду с липидами желтка выявило изменение уровня перекисного окисления в зависимости от вида тяжелого металла. Добавление свинца на уровне одного ПДК приводило к максимальному повышению ТБК-активных продуктов, сохранявшемуся в пробах с увеличенной концентрацией металла до 2 и 10 ПДК соответственно. В модельной системе с растворами кадмия изменение в окислении липидов зависело от концентрации ионов данного металла. Достижение максимального уровня ТБК-активных продуктов соответствовало ПДК свинца. Следует отметить, что аналогичное повышение ТБК-активных продуктов в модельной системе достигается при концентрации ионов кадмия, соответствующей 10 ПДК (рис. 1).

В системах с моделированием загрязнения образцов сырого молока исследуемыми концентрациями тяжелых металлов приводило к иному уровню окислительных процессов. Общий уровень образования перекисей в молоке был значительно ниже, поскольку собственная антиоксидантная система молока способна снижать перекисные процессы [7]. Содержание ТБК-активных продуктов в молоке не зависело от дозы внесения свинца и кадмия, а определялось типом металла. Кадмий в сравнении со свинцом усиливал образование перекисей в два раза (рис. 2).

Оценка общей АОА сыворотки молока (после осаждения белков) амперометрическим методом по эквиваленту галловой кислоты показал отсутствие различий в пробах молока с различной концентрацией свинца. Пробы сыворотки молока, загрязненного кадмием, снижали антиоксидантную активность пропорционально повышению концентрации кадмия (рис. 3). Выявленная закономерность указывает на участие в механизмах антиоксидантной защиты белков молока, что может быть обусловлено особенностью связывания белками молока ионов тяжелых металлов. Показано, что распределение добавленного кадмия в молочной системе происходит

неодинаково: 96% находится в молочной фракции, а 3% связано с жировой фракцией. Кадмий не связывается ни с одной белковой фракцией [8]. Свинец связывается с одним из основных белков молока – ка-

зеином. С использованием спектроскопии Рамана установлены два сайта связывания свинца с альфа-казеином с возможным участием сульфгидрильных групп цистеина [9].

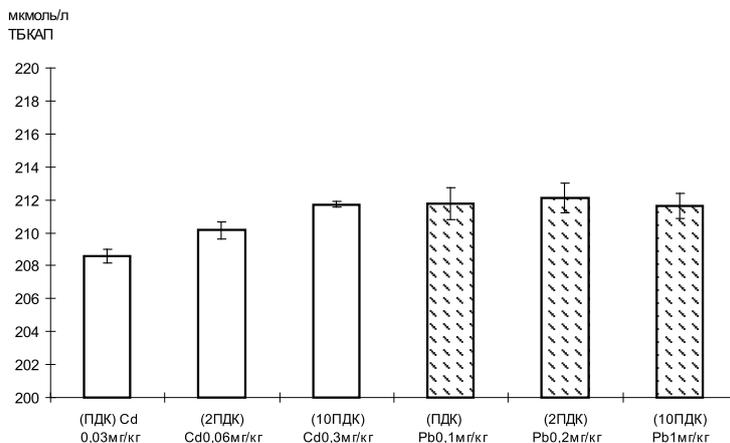


Рис. 1. Уровень ТБК-активных продуктов в модельной системе в зависимости от концентрации тяжелых металлов: светлые столбцы – кадмий, темные столбцы – свинец

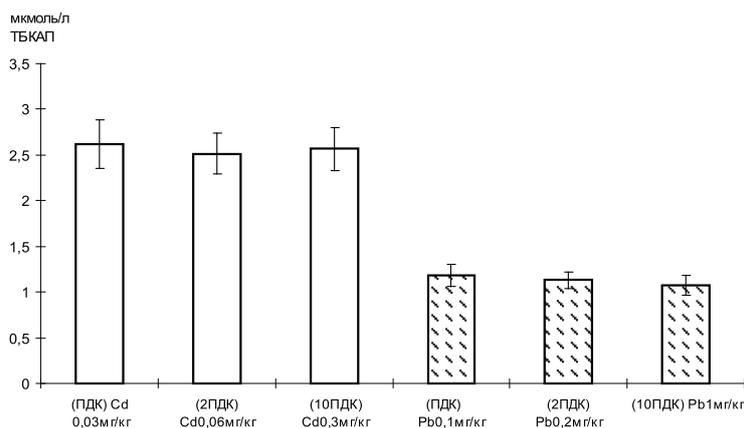


Рис. 2. Уровень ТБК-активных продуктов в модельной системе с добавлением сырого молока в зависимости от концентрации тяжелых металлов: светлые столбцы – кадмий, темные столбцы – свинец

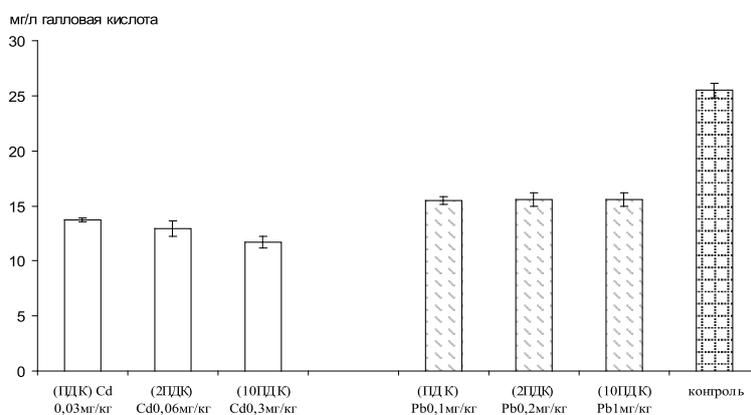


Рис. 3. Общая АОА сыворотки молока (после осаждения белков), загрязненной тяжелыми металлами: светлые столбцы – кадмий, темные столбцы – свинец (в пересчете на концентрацию галловой кислоты)

Сравнительный анализ уровня ТБК-активных продуктов в плазме крови крыс показал, что употребление воды с одинаковой концентрацией исследуемых тяжелых металлов вызвало достоверный рост количества

перекисей в плазме крови у крыс. При этом у животных, употреблявших раствор хлорида кадмия значимо была повышена концентрация перекисей в сравнении с группой, употреблявших раствор хлорида свинца (рис. 4).

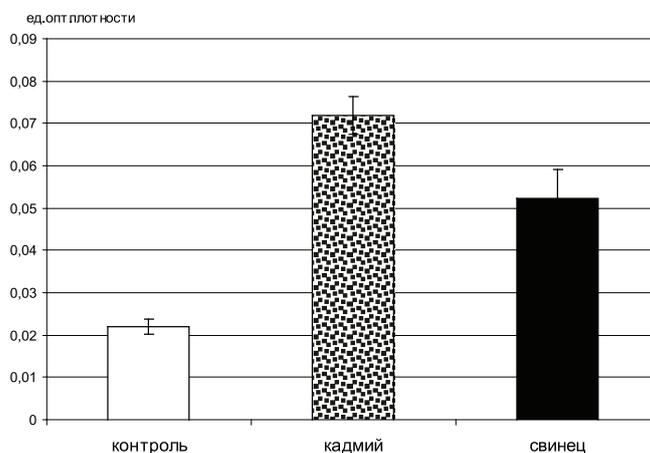


Рис. 4. Уровень ТБК-активных продуктов в плазме крови крыс (в ед. опт. плотности)

Выводы

1. В модельной реакции перекисного окисления с липидами желтка яиц тяжелые металлы инициировали интенсивное окисление липидов. Образование ТБК-активных продуктов в присутствии свинца не зависело от концентрации, а кадмий увеличивал процессы перекисного окисления в зависимости от его уровня.

2. В сыром молоке количество ТБК-активных продуктов выше в пробах, загрязненных кадмием, чем свинцом. Рост ТБК-активных продуктов независимо от концентрации указывает на вовлеченность антиоксидантной системы молока и большую окислительную активность ионов кадмия.

3. Осаждение белков молока выявило различное накопление перекисей в зависимости от концентрации металла. Пробы, содержащие свинец, проявляли одинаковую окислительную активность при концентрации от одного до десяти ПДК. Кадмий в отсутствие белка усиливал окислительные процессы с ростом ПДК. Данные различия могут быть связаны с интенсивностью взаимодействия тяжелых металлов с сульфгидрильными группами белков молока.

4. Статистически достоверный рост ТБК-активных продуктов в плазме крови наблюдался у крыс, получавших в течение 1 месяца хлорид кадмия 50 ppm в питьевой воде, в сравнении с животными, получавшими хлорид свинца.

Список литературы

1. Будкевич Р.О. Влияние употребления воды, загрязненной низкими дозами кадмия, на суточную динамику гормонов у крыс // Вестник Северо-Кавказского государственного технического университета. – 2010. – № 3. – С. 158–162.
2. Будкевич Е.В., Батурич В.А., Будкевич Р.О., Тинькова Е.Л. Некоторые показатели нервной системы у подростков в различных экологических условиях на протяжении дневного бодрствования // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2011. – № 3. – С. 45–47.
3. Евдокимов И.А., Будкевич Р.О., Скороходова М.В. Пищевая безопасность: кадмий, свинец и гормоны стресса в коровьем молоке // Инновационное развитие пищевой, легкой, промышленности и индустрии гостеприимства: Материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 55-летию Алмагитинского технологического университета. – Алматы: АТУ, 2012. – С. 302–303.
4. Катковская М.В., Кухарчик М.А. Определение общей антиоксидантной активности в пробах слюны и мочи студентов с помощью модельной системы / Актуальные проблемы современной медицины 2008: материалы 62-й Международной науч. конф. студентов и молодых ученых. В 2 ч. Ч. 1 / под ред. С.Л. Кабака, А.С. Леонтьева. – Минск: БГМУ, 2008. – С. 173.
5. Котельникова С.В., Котельников А.В. Сезонные особенности функционального состояния надпочечников белых крыс разного пола в норме и при воздействии солью кадмия // Вестник Астраханского государственного технического университета. – 2008. – № 3. – С. – 178–181.
6. Котельникова С.В., Котельников А.В., Соколова Н.Г. Сравнительная характеристика перекисного окисления липидов при интоксикации солью кадмия в разных органах и тканях белых крыс в зимний и летний периоды // Вестник Астраханского государственного технического университета. – 2006. – № 3. – С. 214–217.
7. Шидловская В.П., Юрова Е.А. Антиоксиданты молока их роль в оценке его качества // Молочная промышленность. – 2010. – № 2. – С. 26–27.

8. Roh J.K., Bradley R.L., Richardson J.R., Weckel K.G. Distribution and removal of cadmium from milk // *J. Dairy Sci.* – 1976. – Vol. 59. – № 3. – P. 376–381.

9. Srinivas S., Kaul P., Prakash V. Mechanism of interaction of Pb(II) with milk proteins: a case study of alpha-casein // *J. Agric. Food Chem.* – 2007. – Vol. 55. – № 22. – P. 9283–9288.

References

1. Budkevich R.O. Vliyaniye upotrebleniya vody, zagryaznennoi nizkimi dozami kadmiya, na sutochnuyu dinamiku gormonov u krysv // *Vestnik Severo-Kavkazskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta.* 2010. no. 3. pp. 158–162.

2. Budkevich E.V., Baturin V.A., Budkevich R.O., Tin'kova E.L. Nekotorye pokazateli nervnoi sistemy u podrostkov v razlichnykh ekologicheskikh usloviyakh na protyazhenii dnevnogo boдрstvomaniya // *Meditinskii vestnik Severnogo Kavkaza.* 2011. no. 3. pp. 45–47.

3. Evdokimov I.A., Budkevich R.O., Skorokhodova M.V. Pishchevaya bezopasnost': kadmii, svinets i gormony stressa v korov'em moloke // *Innovatsionnoe razvitie pishchevoi, legkoi, promyshlennosti i industrii gostepriimstva: Materialy Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii, posvyashchennoi 55-letiyu Almatinskogo tekhnologicheskogo universiteta.* Almaty: ATU, 2012. pp. 302–303.

4. Katkovskaya M.V., Kukharchik M.A. Opredelenie obshchei antioksidantnoi aktivnosti v probakh slyuny i mochi studentov s pomoshch'yu model'noi sistemy / Aktual'nye problemy sovremennoi meditsiny 2008: materialy 62-i Mezhdunarodnoi nauch. konf. studentov i molodykh uchenykh. V 2 ch. Ch. 1 / pod red. S. L. Kabaka, A. S. Leontyuka. Minsk: BGMU, 2008. pp. 173.

5. Kotel'nikova S.V., Kotel'nikov A.V. Sezonnnye osobennosti funktsional'nogo sostoyaniya nadpochechnikov belykh

krysv raznogo pola v norme i pri vozdeistvii sol'yu kadmiya // *Vestnik Astrakhanskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta.* 2008. no. 3. pp. 178–181.

6. Kotel'nikova S.V., Kotel'nikov A.V., Sokolova N.G. Sravnitel'naya kharakteristika perekisnogo okisleniya lipidov pri intoksikatsii sol'yu kadmiya v raznykh organakh i tkanyakh belykh krysv v zimnii i letnii periody // *Vestnik Astrakhanskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta.* 2006. no. 3. pp. 214–217.

7. Shidlovskaya V.P., Yurova E.A. Antioksidanty moloka ikh rol' v otsenke ego kachestva // *Molochnaya promyshlennost'.* 2010. no. 2. pp. 26–27.

8. Roh J.K., Bradley R.L., Richardson J.R., Weckel K.G. Distribution and removal of cadmium from milk // *J. Dairy Sci.* 1976. Vol. 59. no. 3. pp. 376–381.

9. Srinivas S., Kaul P., Prakash V. Mechanism of interaction of Pb(II) with milk proteins: a case study of alpha-casein // *J. Agric. Food Chem.* 2007. Vol. 55. no. 22. pp. 9283–9288.

Рецензенты:

Джандарова Т.И., д.б.н., доцент, профессор кафедры анатомии и физиологии, ФГАОУ ВПО «Северо-Кавказский федеральный университет» Минобрнауки РФ, г. Ставрополь;

Цатурян Л.Д., д.м.н., заведующий кафедрой нормальной физиологии, ГБОУ ВПО «Ставропольский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ставрополь.

Работа поступила в редакцию 30.12.2013.