

УДК 615.9:612.05.34:547.424

©Коллектив авторов

## ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК КРОВИ И ПЕЧЕНИ ПРИ ИНГАЛЯЦИОННОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ФОРМАЛЬДЕГИДОМ

*Н.Э.Петушок, В.Г.Петушок, М.А.Ельчанинова, А.А.Баньковский, Р.В.Требухина*

Институт биохимии НАН Беларуси,  
Беларусь, 230017, Гродно, БЛК 50, тел./факс: (375 152) 33 41 21

Исследовали влияние паров формальдегида в концентрации 5 и 10 мг/м<sup>3</sup> на состояние антиоксидантной системы в крови и печени крыс, активность ферментов пентозофосфатного пути обмена углеводов, морфологический состав крови и массу иммунокомпетентных органов. Результаты исследований свидетельствуют о том, что воздействие формальдегида вызывает активацию процессов перекисного окисления липидов в эритроцитах и гепатоцитах. В клетках печени эти изменения происходят на фоне повышения функциональной активности антиоксидантной и детоксикационной систем. Выявлено антивитаминное действие формальдегида в отношении фосфорилированной формы тиамина печени, причем степень выраженности эффекта от дозы токсиканта не зависит. Изменений морфологического состава крови не обнаружено. Ингаляция формальдегида приводила к угнетению вилочковой железы. Этот эффект наблюдается при концентрации формальдегида 10 мг/м<sup>3</sup>, когда и в эритроцитах, и в печени зафиксировано усиление перекисидации липидов.

**Ключевые слова:** формальдегид, глутатион, тиобарбитурат-реагирующие продукты, кровь, печень, крысы

**ВВЕДЕНИЕ.** В национальном докладе о состоянии окружающей среды в Республике Беларусь (1995) среди основных причин ухудшения здоровья населения указывается неблагоприятная экологическая обстановка [1]. Химические вещества, поступающие в значительных количествах в окружающую среду в виде компонентов технологических выбросов промышленных предприятий и транспорта, могут приводить к различным нарушениям метаболических процессов в организме. Использование многочисленных лакокрасочных и клеящих составов на основе мочевино-формальдегидных смол и других сложных композиций, являющихся эмитентами паров формальдегида (ФА), создает предпосылки для возникновения различных заболеваний у работников соответствующих предприятий [2, 3]. Значительные количества ФА содержатся в выхлопных газах автотранспорта, причем самые высокие его концентрации в воздухе находятся на уровне зоны дыхания человека [4]. В условиях эксперимента установлено, что летучие компоненты полимерных материалов, в том числе эпоксидных и фенол-формальдегидных смол, оказывают токсическое действие на организм животных, приводят к угнетению иммунной системы и выраженным биохимическим сдвигам [5]. Выявлены также канцерогенные свойства больших доз ФА [6]. С другой стороны, ФА является активным метаболитом ряда различных метилированных соединений [7], он в виде одноуглеродных фрагментов участвует в биосинтезе белков и пуриновых оснований [8]. Скорость окисления ФА в организме очень высока, сразу после поступления в кровь он подвергается ферментативным превращениям, окисляясь до СО<sub>2</sub>. Повышенные дозы ФА при более длительном

контакте его с клеткой оказывают негативный эффект на активность клеточных ферментов. В опытах *in vitro* показано, что инкубация ФА с кровью человека при 37°C вызывает быстрое разрушение АТР в тромбоцитах и разобщение процессов дыхания и фосфорилирования [9].

Таким образом, тяжесть интоксикации может быть связана с изменением концентрации ФА в окружающей среде и повышением его эндогенного пула. Исходя из вышеизложенного, представляет значительный интерес изучение влияния различных доз ФА на структурные и функциональные свойства клеток. Следует учитывать, что наиболее чувствительными к различным токсическим воздействиям являются ткани, клетки которых активно делятся (клетки костного мозга, иммунокомпетентные органы) или участвуют в обезвреживании токсических веществ (гепатоциты) [5]. Цель настоящего исследования - изучить состояние функциональной активности клеток крови и печени крыс после ингаляционного воздействия различных концентраций ФА.

**МЕТОДИКА.** Эксперименты выполнены на белых беспородных крысах-самках массой 140-160 г. Все животные находились на стандартном рационе вивария. Подопытных животных подвергали ингаляционному воздействию формальдегидом в концентрации 5 или 10 мг/м<sup>3</sup> ежедневно по 7 часов дневного времени в течение 5 дней (суммарная экспозиция 35 часов). На время затравки крыс помещали в специальные камеры объемом 10 л с продувом атмосферного воздуха 2 л/мин вместе с воздухом в камеру поступали пары формальдегида. Часть животных находилась в камерах с продувом только атмосферного воздуха (контроль). После затравки животных пересаживали в клетки (на ночное время). В день эвтаназии крыс помещали в камеры и подвергали ингаляционной затравке формальдегидом в течение 1 часа перед декапитацией. В эксперименте использовано 3 группы крыс (по 6 животных в каждой): контроль и две опытные с разной концентрацией формальдегида в камерах (5 и 10 мг/м<sup>3</sup>). После декапитации кровь собирали в пробирки с антикоагулянтом, печень быстро извлекали и помещали в жидкий азот до использования. Исследовали морфологический состав крови, массу иммунокомпетентных органов. В клетках крови и печени определяли активность ферментов пентозофосфатного пути обмена углеводов [10]. Состояние антиоксидантной системы оценивали по уровню восстановленного глутатиона (GSH) [11], активности сопряженной с ним глутатионредуктазы (ГР) [12], каталазы [13] и содержанию продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-РП) [14, 15]. Полученные экспериментальные результаты обработаны статистически с применением t-критерия Стьюдента.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ** Гематотропное действие ФА оценивали по изменению клеточного состава периферической крови и содержания гемоглобина в эритроцитах (табл. 1). Некоторые гематологические показатели и масса иммунокомпетентных органов сезонно изменялись, поэтому в таблицах 1 и 2 представлены контрольные значения для каждой серии опытов. Несмотря на двукратное различие используемых доз ФА, изменений в морфологических показателях крови отмечено не было. Учитывая то обстоятельство, что ФА является активным метаболитом различных метилированных соединений [8], то, поступая в организм в небольших концентрациях, он не успевает воздействовать на форменные элементы крови и быстро проникает в органы и ткани. Масса иммунокомпетентных органов у экспериментальных животных изменяется в зависимости от воздействовавшей на организм дозы ФА. Масса селезенки повышается незначительно (табл. 2), масса вилочковой железы не изменяется при воздействии ФА в концентрации 5 мг/м<sup>3</sup> и достоверно снижается на 38% при повышении его дозы в 2 раза. Активность ферментов пентозофосфатного пути обмена углеводов и сопряженных с ними ферментов в крови представлена в таблице 3. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и транскетолазы в клетках крови не отличается от контрольных величин, что может косвенно свидетельствовать о краткосрочности пребывания ФА в периферической крови. К первичным химическим реакциям, возникающим непосредственно после ингаляционной затравки животных ФА, можно отнести изменения процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ).

Таблица 1 Морфологические показатели крови у крыс после ингаляционного воздействия формальдегида

Воздействие	Гемоглобин, г/л	Эритроциты, $\times 10^{12}/л$	Лейкоциты, $\times 10^9/л$
Контроль	$97,5 \pm 4,6$	$7,86 \pm 0,26$	$9,52 \pm 0,35$
Формальдегид, 5 мг/м <sup>3</sup>	$95,8 \pm 2,7$	$7,79 \pm 0,45$	$8,72 \pm 0,23$
Контроль	$111,2 \pm 3,82$	$8,22 \pm 0,37$	$9,40 \pm 0,76$
Формальдегид, 10 мг/м <sup>3</sup>	$100,6 \pm 4,95$	$8,23 \pm 0,73$	$9,48 \pm 0,70$

Таблица 2 Масса иммунокомпетентных органов крыс после ингаляционного воздействия формальдегида по сравнению с контролем (\* -  $p < 0,05$ )

Воздействие	Селезенка		Тимус	
	мг	%	мг	%
Контроль	$691,5 \pm 56,8$	100	$309,3 \pm 30,5$	100
Формальдегид, 5 мг/м <sup>3</sup>	$806,9 \pm 14,7$	117	$290,3 \pm 37,9$	95
Контроль	$686,2 \pm 68,4$	100	$236,7 \pm 37,4$	100
Формальдегид, 10 мг/м <sup>3</sup>	$762,9 \pm 24,6$	111	$146,8 \pm 8,9 *$	62

Интенсификация ПОЛ проявляется в накоплении в исследованных клетках его продуктов, в частности, продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-РП). Доза в 5 мг/м<sup>3</sup> вызывает снижение уровня ТБК-РП в эритроцитах на 26%. Повышение концентрации ФА в затравочной камере до 10 мг/м<sup>3</sup> способствует возрастанию концентрации ТБК-РП в эритроцитах на 19%. Согласно современным представлениям, регуляция ПОЛ и биологическая защита клеток от негативных процессов перекисления осуществляется биоантиоксидантами и специализированными антиоксидантными ферментами [16], к которым, в частности, относятся глутатионредуктаза (ГР), каталаза и восстановленный глутатион (GSH). Полученные нами данные свидетельствуют о наличии связи между накоплением продуктов ПОЛ и глутатионзависимой системой (табл. 3). Повышение активности ГР, стабильность уровня GSH и активности каталазы препятствует избыточному накоплению ТБК-РП в крови крыс, подвергшихся ингаляционной затравке ФА в дозе 5 мг/м<sup>3</sup>. Увеличение дозы ФА до 10 мг/м<sup>3</sup> не вызвало изменений уровня GSH, но, вероятно, способствовало активации процессов ПОЛ с последующим накоплением их вторичных продуктов.

Более существенные изменения исследуемых показателей нами обнаружены в печеночной ткани. Известно, что обезвреживание ФА в клетках данной ткани происходит при взаимодействии с рядом ферментных систем, обеспечивающих метаболизм альдегидов и обладающих довольно широкой специфичностью [17]. В этом процессе может принимать участие и каталаза, обеспечивающая за счет пероксидазного действия окисление формата до СО<sub>2</sub>. Подтверждающим это фактом является увеличение активности каталазы в 2 раза при увеличении концентрации

Таблица 3 Активность ферментов в крови крыс после ингаляционного воздействия формальдегида по сравнению с контролем (\* -  $p < 0,05$ )

Исследуемые показатели	Контроль	Формальдегид	
		5 мг/м <sup>3</sup>	10 мг/м <sup>3</sup>
Транскетолаза, нмоль С-7-Ф/мл крови/мин	$73,3 \pm 2,2$	$78,3 \pm 2,8$	$80,0 \pm 6,5$
Г-6-Ф ДГ, мкмоль NADPH /мл крови/мин	$2,33 \pm 0,10$	$2,26 \pm 0,08$	$2,14 \pm 0,07$
Глутатионредуктаза, нмоль NADPH /мл крови/мин	$0,49 \pm 0,06$	$0,74 \pm 0,09*$	—
Каталаза, мкмоль/мл плазмы/мин	$0,135 \pm 0,005$	$0,140 \pm 0,012$	$0,129 \pm 0,007$
Глутатион, мкмоль/мл эритроцитов	$2,07 \pm 0,05$	$2,23 \pm 0,09$	$1,93 \pm 0,11$
ТБК-РП, мкмоль/мл эритроцитов	$17,2 \pm 0,89$	$14,4 \pm 0,71 *$	$19,5 \pm 0,51 *$

воздействующих на организм крыс паров ФА до 10 мг/м<sup>3</sup>. Однако, считается, что основные метаболические превращения ФА происходят в печени при участии фермента формальдегиддегидрогеназы, коферментом которого является глутатион. То есть уровень GSH в клетках влияет на интенсивность метаболизма формальдегида. В то же время, воздействие ФА на организм при его алиментарном поступлении в больших концентрациях сопровождается падением уровня восстановленного глутатиона в тканях печени, что затрудняет метаболизм этого ксенобиотика до конечных нетоксичных продуктов [18]. В нашем эксперименте содержание GSH в гепатоцитах после ингаляционного воздействия формальдегида в концентрации 5 мг/м<sup>3</sup> от контроля достоверно не отличалось, а при увеличении дозы токсиканта до 10 мг/м<sup>3</sup> достоверно увеличивалось. Эти результаты позволяют предположить, что скорость начального этапа детоксикации формальдегида не была лимитирована. Возрастание концентрации GSH может быть своего рода метаболической компенсацией, развивающейся в ответ на активное расходование этого трипептида в детоксикационных процессах. Здесь уместно напомнить, что при воздействии ксенобиотиков GSH требуется и для образования меркаптуровых кислот, а на факторы, первично снижающие уровень GSH, клетка, как правило, отвечает его сверхпродукцией [19]. Рост концентрации GSH, вероятнее всего, достигается за счет активации его синтеза. Гепатоцит, как установлено [20], обладает ферментной системой синтеза GSH, который впоследствии может подвергаться межорганному распределению.

В печени животных, подвергнутых действию паров формальдегида в концентрации 10 мг/м<sup>3</sup>, нами наблюдался и рост активности ГР - фермента, регенерирующего восстановленный глутатион из его окисленной формы. Такое изменение косвенно отражает рост интенсивности антиоксидантных процессов в клетке. Ведь субстратом глутатионредуктазной реакции является окисленный глутатион, который ферментативно и неферментативно образуется в антирадикальных процессах.

Выявлена дозовая зависимость в нарушении углеводного обмена. Активность транскетолазы постепенно снижалась, а глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы - повышалась (табл. 4). Пониженная активность транскетолазы сопряжена с дефицитом кофермента (ТДФ) у крыс после воздействия ФА.

*Таблица 4. Активность ферментов и уровень субстратов в печени крыс после ингаляционного воздействия формальдегида*

Исследуемые показатели	Контроль	Формальдегид	
		5 мг/м <sup>3</sup>	10 мг/м <sup>3</sup>
Транскетолаза, мкмоль С-7-Ф/г ткани/мин	4,18 ± 0,16	3,68 ± 0,17 *	3,36 ± 0,11 *
Г-6-Ф ДГ, мкмоль NADPH /г ткани/мин	1,64 ± 0,07	1,91 ± 0,10 *	2,11 ± 0,10 *
Глутатионредуктаза, нмоль NADPH /г ткани/мин	13,6 ± 1,6	12,9 ± 0,9	18,0 ± 1,2 *
Каталаза, мкмоль/г ткани/мин	63,4 ± 3,8	57,9 ± 4,6	134,4 ± 7,2 *
Глутатион, мкмоль/г ткани	5,78 ± 0,44	5,83 ± 0,38	7,78 ± 0,46 *
Тиаминдифосфат, мкг/г ткани	5,6 ± 0,5	4,1 ± 0,25 *	4,28 ± 0,33 *
ТБК-РП, мкмоль/мл эритроцитов	31,1 ± 1,7	42,6 ± 3,0 *	54,0 ± 2,9 *

При ингаляционном воздействии ФА в исследуемых дозах в печени крыс происходит выраженная активация ПОЛ. При воздействии большей концентрации ФА уровень продуктов ПОЛ оставался в гепатоцитах высоким (173%), несмотря на значительную (на 211%) активацию антиоксидантного фермента каталазы и рост активности ГР, что свидетельствует о недостаточной функциональной активности антиоксидантной системы в данной ситуации.

**ВЫВОДЫ:** Таким образом, полученные нами результаты и анализ литературных данных позволяют сделать следующие выводы:

- зависимость доза - эффект ФА в крови и печени проявляет нелинейный характер;
- биологический эффект ФА на исследуемые ткани определяется соотношением реакций, формирующих устойчивое равновесие антиоксидантной

системы (глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, глутатионредуктаза, каталаза, восстановленный глутатион) с реакциями свободнорадикального окисления и накоплением токсических продуктов перекисного окисления липидов (ТБК-РП).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Национальный доклад о состоянии окружающей среды в Республике Беларусь за 1994 г. Минск, 1995. 186 с.
2. Сидоренко Е.Н., Мухтарова Н.Д., Козинцева П.В. (1983) Здравоохранение Белоруссии, № 2. 40-43.
3. Стельмах В.А. (1994) В кн.: Актуальные проблемы современной медицины. Тез. докл. научн. конф. Витебск. с. 17-18.
4. Петренко Н.М. (2000) В кн.: Эколого-профилактические проблемы здоровья населения. Материалы международной научно-практической конференции. - Гродно. с. 91-96.
5. Фролов В.М., Пересадин Н.А., Петруня А.М. (1995) Журнал микробиологии, № 2, 119-123.
6. Uehleke H. (1983) Umweltmedizin, 6, № 4, 72-74.
7. Мецлер Д. (1980) Биохимия. М: Мир. 1980, т. 2.
8. Румянцев А.П., Тиунова Л.В., Остроумова Н.А. (1981) Итоги науки и техники. Токсикология. 12, 98-103.
9. Парк Д. В. (1973) Биохимия чужеродных соединений. М.: Медицина.
10. Островский Ю.М. (ред.) Экспериментальная витаминология, (1979) Минск: Наука и техника, с.202 - 213.
11. Sedlak J., Lindsay R.H. (1968) Anal. Biochem., 25, 192- 205.
12. Хотимченко С.А., Алексеева И.А., Гвоздева Л.Г. и др. (1987) Теоретические и клинические аспекты науки о питании. Методы оценки обеспеченности населения витаминами: Сб. научн. трудов. М., 8, 107 - 109.
13. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. и др. (1988) Лаб. дело, № 1, 16-19.
14. Бенисович В.И., Идельсон Л.И. (1973) Вopr. мед. химии, 19, 596 - 599.
15. Placer Z.A., Cushman L., Johnson B.C. (1966) Anal. Biochem., 18, 515 - 519.
16. Halliwell B., Cross C.E. (1994) Environmental Health Perspectives., 102, Suppl., 10, 5-12.
17. Chance B., Sies H., Boveris A. (1979) Physiol. Res., 59, 527-605.
18. Zitting A., Savolainen H. (1980) Pathol. Pharmacol., 27, 157 - 162.
19. Meister A. (1992) Biochem. Pharmacol., 44, 1905 - 1915
20. Masayasu I. (1985) Renal Biochemistry. - Elsevier Sc. Publishers., p.225- 269

Поступила 07.02.2002

## FUNCTIONAL ACTIVITY OF BLOOD AND LIVER CELLS UNDER FORMALDEHYDE INTOXICATION VIA INHALATION

N.E.Petushok, V.G.Petushok, M.A.Yelchaninova, A.A.Bankovsky, R.V. Trebukhina

Institute of Biochemistry Nat. Ac. Sc. of Belarus,  
BLK 50, 230017, Grodno, Belarus, tel/fax (375 152) 33 41 21

The influence of formaldehyde (of 5 and 10 mg/m<sup>3</sup>) on the state of the antioxidant system the blood and liver of rats, the activity of pentose phosphate pathway enzymes, and weight of immune organs was investigated. Formaldehyde intoxication led to activation of lipid peroxidation processes in red blood cells and hepatocytes. In the liver cells these changes were accompanied by activation of the antioxidant and detoxification systems. Formaldehyde depleted thiamine diphosphate in the liver, and this effect was not dose-dependent. The number of blood cells remained unchanged. Formaldehyde at the concentration of 10 mg/m<sup>3</sup> exerted the negative effect on the thymus. This effect may be related to stimulation of lipid peroxidation.

**Key words:** formaldehyde, glutathione, thiobarbituric acid reactive substances, blood, liver, rats.