Наконечна О.А.[1], Резуненко Ю.К.[1], Жерновая М.Є.[2], Артюгіна Л.І.[1], Мартинова С.М.[1]

[1]Харківський національний медичний університет (Харків)

[2]Луганський державний медичний університет (Рубіжне)

ОСОБЛИВОСТІ РОЗВИТКУ ОКСИДАТИВНИХ ПРОЦЕСІВ У ЩУРІВ В УМОВАХ СУБТОКСИЧНОЇ ДІЇ ПОЛІОКСИПРОПІЛЕНГЛІКОЛЮ МОЛЕКУЛЯРНОЇ МАСИ 500 (Л-502-2-10)

Вступ

Сучасний рівень товарного виробництва характеризується інтенсивним розвитком хімічної промисловості й побутової хімії. На широкому використанні її продукції, зокрема пластмас, хімічних волокон, синтетичних каучуків, поверхнево-активних речовин, епоксидних смол та ін. базується науково-технічний прогрес багатьох галузей народного господарства. Розповсюдження масштабів хімії органічного синтезу привело до накопичення в біосфері значної кількості токсичних сполук, які володіють широким спектром біологічної активності, у тому числі здатністю формувати віддалені наслідки. На сьогоднішній термін виник суттєвий розрив між високою здатністю сучасної цивілізації створювати новий хімічний потенціал та обмеженими можливостями суспільства й біосфери в цілому, сприйняти дію цього потенціалу з достатньою ефективністю й без серйозних наслідків [1–3]. В останнє десятиріччя склалася така ситуація, коли вплив комбінації різних ксенобіотиків на організм людини й об’єкти оточуючого середовища важко спрогнозувати. Безконтрольне використання хімічних сполук може мати невиправлені наслідки для середовища мешкання людини [1, 2]. Основними забруднювачами в останні 20 років стали хімічні комбінати по виробництву поверхнево-активних речовин, простих поліефірів, які за обсягом та асортиментом випущеної продукції займають провідне місце у світі [4, 5]. В умовах зростаючого хімічного навантаження на біосферу підвищується й число екологічно обумовлених захворювань і патологічних станів. Основне місце в структурі захворювання на теперішній час посідають злоякісні новоутворення, ішемічна хвороба серця, виразкова хвороба шлунку й дванадцятипалої кишки, цукровий діабет, імунологічна недостатність, захворювання органів дихання й ін. Враховуючі вищесказане, актуальним є пошук засобів попередження розвитку екологічно обумовлених захворювань і патологічних станів на основі обгрунтування патохімічних механізмів структурно-метаболічних порушень та їх корекції в умовах тривалої субтоксичної дії ксенобіотиків на організм. Багатьма авторами було переконливо показано про неможливість формування екологічно обумовлених патологічних станів без активації оксидативного процесу й розвитку мембран-ної вільнорадикальної патології [3]. Було доведено, що інтенсивність радика-лоутворення й стан антиокислювальної активності є ведучими патогенетич-ними ланцюгами розвитку гіпоксії, деструктивних і дистрофічних процесів у різних

органах і тканинах при дії на організм хімічних сполук [4, 5].

Метою роботи було вивчення особливості формування оксидативних процесів у щурів в умовах субтоксичної дії в підгострому експерименті поліоксипропіленгліколю.

Матеріали й методи дослідження

Вибір поліоксипропіленгліколю молекулярної маси 500, який має товарну назву «Лапрол» – Л-502-2-10, обгрунтовано великими об'ємами виробництва, широким застосуванням у різних галузях народного господарства, потенціальною небезпекою для теплокровних тварин і необхідністю розкриття патохімічних механізмів структурно-метаболічних порушень, що виникають в умовах тривалого субтоксичного впливу на організм. Л-502-2-10 являє собою прозору рідину, яка добре розчинна у воді й органічних неполярних сполуках – ефірі, бензолі, толуолі, спиртах. На підставі гострої токсичності Л-502-2-10 відноситься до помірно токсичних сполук. Його середньолетальна доза ($ДЛ_{50}$) була встановлена на рівнях 1,83 і 2,13 г/кг маси тварин, відповідно для щурів популяції Вістар і білих мишей [5]. Програма експерименту передбачала проведення тривалого підгострого досліду на статевозрілих щурах, масою 190–200 г. Тварини протягом 60 діб підлягали пероральному впливу ксенобіотика в 1/10, 1/100 й 1/1000 $ДЛ_{50}$. Ксенобіотик у вигляді водного розчину вводили внутрішньошлунково за допомогою металевого зонда щоранку. Група порівняння – контрольна отримувала відповідні об'єми питної води. У кожній групі як контроля, так і експерименту нараховувалося по 10 тварин. При проведенні досліджень дотримувалися біоетики й принципів «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших цілей» (Страсбург, 1986). Враховуючи наявність поверхнево-активних властивостей в Л-502-2-10 було вивчено вплив даного ксенобіотика на вільнорадикальні процеси, перекисне окислення ліпідів (ПОЛ), окислювальну модифікацію білків і показники антирадикального й антиперекисного захисту. Про стан ПОЛ судили за вмістом малонового діальдегіду (МДА) і дієнових кон'югатів (ДК) у сироватці крові [6, 7]. Стан антиоксидантної системи оцінювався за активністю ферментів каталази [8] і глутатіонпероксидази (ГПО) крові [9], супероксиддисмутази – СОД [10] і церулоплазміну (ЦП) сироватки крові [11, 12], вмісту в крові відновленого глутатіону (Г-SH) [13] і вільних сульфгідрильних груп (SH-груп) [13]. Інтенсивність вільнорадикальних процесів визначалася в сироватці крові з використанням надслабкої люмінол-залежної, індукованої H_2O_2, хемілюмінесценції – ЛЗ IH_2O_2 ХЛ [3–5]. Окислювальна модифікація білків вивчалася за визначенням у сироватці крові рівня 2,4-динітрофенілальдогідразонів (2,4-ДНФАГ) (λ=370 нм) і 2,4-динітрофенілкетогідразонів (2,4-ДНФКГ) (λ=380 нм) [14]. Оцінка стану оксидативних процесів та антиоксидантної активності здійснювалася в динаміці на 30 й 60 добу експерименту. Результати дослідження опрацьовувалися методами варіаційної статистики з оцінкою вірогідності по Стьюденту-Фішеру.

Результати дослідження та їх обговорення

Вивчення стану оксидативних процесів, ПОЛ та окислювальної модифікації білків на 30 добу токсифікації дослідних тварин виявило підвищення інтенсивності ЛЗ IH_2O_2 ХЛ, вмісту МДА, ДК, 2,4-ДНФАГ і 2,4-ДНФКГ під впливом Л-502-2-10 в 1/10 та 1/100 $ДЛ_{50}$ (Табл. 1).

Таблиця 1

Вплив Л-502-2-10 на вільнорадикальні процеси, ПОЛ та окислювальну модифікацію білків у динаміці при тривалій токсифікації щурів на 30 добу експерименту

Показники	Група спостереження, M±m ($ДЛ_{50}$)			
	Контроль (n=10)	1/10 (n=10)	1/100 (n=10)	1/1000 (n=10)
ЛЗ IH_2O_2 ХЛ, I^o-імп /с	1320,5±28,2	2487,6±31,5	2263,7±30,6	1835,4±17,2
МДА, мкмоль / л	5,56±0,42	14,63±0,97*	11,75±0,88*	5,84±0,66
ДК, мкмоль / л	21,63±1,74	52,73±3,15*	48,94±3,56*	22,75±1,84
2,4-ДНФАГ, од. опт. щільн / г білка	20,48±1,62	61,32±4,38*	48,24±2,73*	21,62±1,56
2,4-ДНФКГ, од. опт. щільн / г білка	25,76±1,85	67,14±4,25*	55,68±3,10*	24,80±1,43

Примітка: * – різниця вірогідна $p < 0,05$

Дослідження показали, що ксенобіотик, відповідно в 1/10 й 1/100 $ДЛ_{50}$ стимулює зростання інтенсивності ЛЗ IH_2O_2 ХЛ на 88,4% й 71,4%, рівня МДА – на 163,13% й 111,33%, ДК – на 143,78% й 126,25%, 2,4-ДНФАГ – на 199,41% й 135,54%, 2,4-ДНФКГ – на 160,63% й 116,15%. Ці дані свідчать, що поліоксипропіленгліколь на 30 добу токсифікації дослідних тварин викликає активацію вільнорадикальних процесів, стимулює ПОЛ та окислювальну модифікацію білків, що може бути важливим ланцюгом розвитку молекулярної мембранної патології, яка лежить в основі багатьох екологічно обумовлених захворювань і патологічних станів [1–3]. Суттєве підвищення інтенсивності ЛЗ IH_2O_2 ХЛ може бути важливим показником індукції під впливом Л-502-2-10 супероксидного аніон-радикалу кисню, активованих гідроперекисів, вільних радикалів, перекисів та інших реакційноздатних форм кисню [2, 3].

Дослідження впливу Л-502-2-10 на вільнорадикальні процеси, ПОЛ та окислювальну модифікацію білків при тривалій токсифікації щурів виявили по завершенню підгострого експерименту (на 60 добу) значне пригнічення інтенсивності ЛЗ IH_2O_2 ХЛ у групі тварин, які отримували 1/10 $ДЛ_{50}$ (Табл. 2).

Таблиця 2

Вплив Л-502-2-10 на вільнорадикальні процеси, ПОЛ та окислювальну модифікацію білків у динаміці при тривалій токсифікації щурів на 60 добу експерименту

Показники	Група спостереження, M±m ($ДЛ_{50}$)			
	Контроль (n=10)	1/10 (n=10)	1/100 (n=10)	1/1000 (n=10)
ЛЗ IH_2O_2 ХЛ, I^o-імп /с	1315,6±27,6	987,4±18,5	2356,8±34,2	1887,7±15,8
МДА, мкмоль / л	5,85±0,43	23,74±2,12*	13,68±1,45*	6,10±0,52
ДК, мкмоль / л	21,16±1,38	78,66±3,75*	47,60±4,13*	20,63±1,44
2,4-ДНФАГ, од. опт. щільн / г білка	22,46±1,84	71,87±3,56*	42,53±3,74*	23,56±2,10
2,4-ДНФКГ, од. опт. щільн / г білка	26,53±1,75	77,24±3,22*	48,25±3,68*	27,68±1,86

Примітка: * – різниця вірогідна $p < 0,05$

У цій дозі інтенсивність надслабкої хемілюмінесценції знижувалася на 24,95% в порівнянні з групою контроля. На думку багатьох авторів, така динаміка інтенсивності ЛЗ IH_2O_2 ХЛ може вказувати на пригнічення біоенергетики й розвиток дистрофічних і деструктивних процесів у різних органах і тканинах, що супроводжується вивільненням у кров'яне русло великої кількості антиокислювачів – SH-груп, сірковмісних сполук, холестерину, амінокислоти L-цистеїну й інших гасителів електронних збуджених станів [3, 4]. Проте необхідно відмітити, що в 1/100 і 1/1000 $ДЛ_{50}$ «Лапрол» підвищував хемілюмінесценцію, відповідно на 79,14% й 43,48%, що вказує на стимуляцію в даних дозах вільнорадикальних процесів і ПОЛ. На цьому тлі відмічалося, по завершенню підгострої токсифікації, подальше накопичення в сироватці крові МДА, ДК, 2,4-ДНФАГ і 2,4-ДНФКГ. Так, вміст МДА підвищувався на 305,8% й 132,8%, ДК – на 271,73% й 224,95%, 2,4-ДНФАГ – на 219,99% й 89,35%, 2,4-ДНФКГ – на 191,14% й 81,86%, відповідно під впливом 1/10 і 1/100 $ДЛ_{50}$. Аналіз показує, що під впливом 1/10 $ДЛ_{50}$ на 60 добу спостерігається подальше суттєве підвищення продуктів ПОЛ та окислювальної модифікації білків у сироватці крові в порівнянні з 30 добою експерименту. Ці дані, а також результати хемілюмінесценції показують, що 1/10 $ДЛ_{50}$ призводить до зриву захисно-пристосувальних механізмів і розвитку дистрофічних процесів. У той же час, 1/100 $ДЛ_{50}$ на 60 добу практично не приводила до зростання в сироватці крові продуктів ПОЛ та окислювальної модифікації білків у порівнянні з 30 добою, а в деяких випадках спостерігалося навіть зниження, що вказує на розвиток стійкої адаптації щурів до оксидативного стресу. В усіх випадках 1/1000 $ДЛ_{50}$ не впливала на показники вільнорадикальних процесів, ПОЛ та окислювальну модифікацію білків.

Відомо, що оксидативним процесам антагоністом виступає антиокислювальна система, яка знешкоджує й гальмує утворення активних форм

кисню. Результати дослідження системи антиоксидантного захисту на 30 добу токсифікації тварин виявили підвищення в крові активності каталази, ГПО, СОД, ЦП і рівня Г-SH під впливом Л-502-2-10 в 1/10 та 1/100 $ДЛ_{50.}$ На цьому тлі спостерігалося зниження в крові вмісту SH-груп (Табл. 3).

Так активність каталази підвищувалася на 183,56% й 113,92%, ГПО – на 142,79% й 75,61%, СОД – на 217,57% й 129,09%, ЦП – на 115,41% й 53,33%, рівень Г-SH зростав на 82,27% й 50,0%, відповідно в групах тварин, токсифікованих 1/10 й 1/100 $ДЛ_{50.}$ Ці дані свідчать, що ксенобіотик на 30 добу спостереження активує антирадикальний, антиперекисний захист організму. Зменшення вмісту SH-груп у крові на 50,3% й 31,43% під впливом 1/10 й 1/100 $ДЛ_{50}$ може свідчити про використання їх на антирадикальний захист, а також для відновлювальних синтезів, що спрямовані на забезпечення гомеостатичної функції організму, особливо під впливом 1/10 $ДЛ_{50}$.

Таблиця 3

Вплив Л-502-2-10 на стан антиоксидантної системи при тривалій токсифікації щурів на 30 добу експерименту

Показники	Група спостереження, M±m ($ДЛ_{50}$)			
	Контроль (n=10)	1/10 (n=10)	1/100 (n=10)	1/1000 (n=10)
Каталаза, мккат /г Hb	4,38±0,37	12,42±1,16*	9,37±0,85*	5,10±0,46
ГПО, мккат / г Hb	6,52±0,58	15,83±1,27*	11,45±0,36*	6,75±0,58
СОД, од / мл сироватки хв	1,65±0,14	5,24±0,46*	3,78±0,43*	1,76±0,16
ЦП, мкмоль / л	2,40±0,26	5,17±0,39*	3,68±0,27*	2,54±0,22
Г-SH, ммоль / л	1,58±0,12	2,88±0,24*	2,37±0,18*	1,65±0,09
SH-групи, ммоль / л	27,65±1,83	13,74±1,17*	18,96±1,35*	26,84±1,76

Примітка: * – різниця вірогідна $p < 0,05$

Результати оцінки стану системи антирадикального й антиперекисного захисту в щурів на 60 добу підгострого експерименту виявили значне зниження активності ферменту каталази, ГПО й рівня в крові Г-SH під впливом як 1/10, так і 1/100 $ДЛ_{50}$ (Табл. 4). Більш суттєвим було зниження

Таблиця 4

Вплив Л-502-2-10 на стан антиоксидантної системи при тривалій токсифікації щурів на 60 добу експерименту

Показники	Група спостереження, M±m ($ДЛ_{50}$)			
	Контроль (n=10)	1/10 (n=10)	1/100 (n=10)	1/1000 (n=10)
Каталаза, мккат/ г Hb	4,47±0,39	1,42±0,09*	2,73±0,31*	4,64±0,48
ГПО, мккат / г Hb	6,55±0,44	2,76±0,25*	4,18±0,36*	6,27±0,53

СОД, од / мл сироватки · хв	1,71±0,26	5,68±0,43*	4,47±0,38*	2,10±0,28
ЦП, мкмоль / л	2,45±0,28	5,84±0,56*	4,23±0,25*	2,62±0,24
Г-SH, ммоль / л	1,62±0,15	0,74±0,08*	1,12±0,14*	1,73±0,16
SH-групи, ммоль / л	28,43±1,76	46,53±3,42*	38,65±2,17*	27,64±1,83

Примітка: * – різниця вірогідна $p < 0,05$

цих показників у групі тварин, токсифікованих 1/10 $ДЛ_{50}$ у порівнянні з 30 добою спостереження. В 1/100 $ДЛ_{50}$ активність каталази й ГПО, а також вміст Г-SH на 60 добу в меншій мірі знижувались у порівнянні з 30 добою, що вказує на значну напругу адаптаційних і захисно-пристосувальних механізмів. На цьому тлі спостерігалося подальше підвищення активності СОД (на 232,16% й 161,40%) і ЦП (на 138,36% й 72,65%), відповідно в групах тварин, токсифікованих 1/10 й 1/100 $ДЛ_{50}$. Рівень SH-груп у крові зростав на 63,65% й 35,94% на 60 добу, тоді як на 30 добу експерименту він був знижений на 50,31% й 31,43%, відповідно під впливом 1/10 й 1/100 $ДЛ_{50}$. Аналіз показників антиоксидантної системи свідчить, що Л-502-2-10 в 1/10 $ДЛ_{50}$ пригнічує при тривалій субтоксичній дії антирадикальну й антиперекисну активність на 60 добу експерименту. В 1/100 $ДЛ_{50}$ ксенобіотик забезпечує значну напругу захисно-пристосувальних механізмів, спрямованих на підтримку гомеостатичної функції організму. Проте слід відмітити, що більш тривала дія цієї дози може привести до зриву адаптаційних процесів і розвитку патологічних станів. Ксенобіотик в 1/1000 $ДЛ_{50}$ не впливав на стан системи антирадикального й антиперекисного захисту.

Висновки

Таким чином, результати дослідження свідчать, що поліоксипропілен-гліколь Л-502-2-10 в умовах субтоксичної дії на щурів на 30 добу токсифікації активує вільнорадикальні процеси, ПОЛ, окислювальну модифікацію білків, а також системи антирадикального й антиперекисного захисту під впливом 1/10 й 1/100 $ДЛ_{50}$. Подальше надходження ксенобіотика пероральним шляхом до організму в 1/10 $ДЛ_{50}$ призводить до активації вільнорадикальних процесів, ПОЛ, окислювальної модифікації білків на тлі виснаження антиоксидантної системи, що формує розвиток дистрофічних і деструктивних змін у різних органах і тканинах у терміни завершення підгострого експерименту (60 доба). В 1/100 $ДЛ_{50}$ «Лапрол» на 60 добу стимулює оксидативні процеси й систему антирадикального й антиперекисного захисту. В 1/1000 $ДЛ_{50}$ Л-502-2-10 не впливав на показники, що характеризують оксидантно-антиоксидантний гомеостаз.

Література:

1. Щербань Н.Г. Оценка рисков здоровья населения от опасных отходов (Биохимические аспекты) / Щербань Н.Г., Жуков В.И., Мясоедов В.В. – Харьков: «Апостроф», 2010. – 156 с.

2. Биохимические аспекты экологической патологии, связанной с химическим

загрязнением поверхностных источников водоснабжения / Н.Г. Щербань, В.И.Жуков, В.В. Мясоедов, Ю.К. Резуненко– Харьвов: «Раритеты Украины», 2011. – 176 с.
3. Детергенты – модуляторы радиомиметических эффектов / [В.И. Жуков, В.В. Мясоедов, Ю.И. Козин и др.] – Белгород: «Белвитамины», 2000. – 375 с.
4. Актуальные вопросы экологии и гигиены в производстве тормозных гидкостей / [А.Я. Циганенко., Н.Г. Щербань, В.И. Пивень и др.] – Белгород: «Полисинтез», 2001. – 235 с.
5. Простые и макроциклические эфиры: научные основы охраны водных объектов / [В.И. Жуков, Л.Д. Попова, О.В. Зайцева и др. – Харьков: «Торнадо», 2000. – 438 с.
6. Фёдорова Т.К. Реакция с ТБК для определения МДА крови методом флуориметрии / Т.К. Фёдорова, Т.С. Коршунова, Э.Т. Ларская // Лаб. дело. – 1983. – № 3. – С. 25–28.
7. Гаврилов Б.В. СФ-метрическое определение содержания ГПЛ в плазме крови / Б.В. Гаврилов, М.И. Мишкорудная // Лаб. дело. – 1983. – № 3. – С. 33–36.
8. Дубинина Е.Е. Методы определения каталазы / Е.Е. Дубинина, Л.Ф. Ефимова, Л.Н. Сафронова // Лаб. дело. – 1988. – № 8. – С. 16–19.
9. Меин В.М. Простой и специфический метод определения активности ГПО в эритроцитах / В.М. Меин // Лаб. дело. – 1986. – № 2. – С. 724–727.
10. Костюк В.А. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцитина / В.А. Костюк // Вопросы мед. химии. – 1990. – Т. 36, № 2. – С. 28–35.
11. Подильчак М.Д. Клиническая энзимология // Определение церулоплазмина в сыворотке крови по Равину. – Киев: «Здоровье». – 1967. – С. 85–87.
12. Мошков К.А. Определение ферментативной активности и иммунореактивности церулоплазмина в сыворотке крови человека / К.А. Мошков // Лаб. дело. – 1985. – № 7. – С. 390–395.
13. Северин С.Е. Практикум по биохимии / С.Е. Северин, Т.А. Соловьёва – М.: Изд-во МГУ, 1989. – 509 с.
14 Дубинина Е.Е. Окислительная модификация белка. Методы определения / Е.Е. Дубинина, Р.О. Бурмистрова [и др.] // Вопр. мед. химии. – 1996. – Т. 41, Вып. 1. – С. 24–26.