

# МЕДИКО-ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ ПРИРОДООХРАННОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ

---

УДК 613.2-613.29

**В.І. ЖУКОВ**, докт. мед. наук, докт. біол. наук, професор,  
**М.Г. ЩЕРБАНЬ**, докт. мед. наук, професор, **О.В. ЗАЙЦЕВА**, **А.І. БЕЗРОДНА**,  
**Н.А. ВАЩУК**, **Ю.К. РЕЗУНЕНКО**, **П.В. ОВЕТЧИН**, **В.О. ТЕЛЕГІН**  
Харківський національний медичний університет, м. Харків

## **ВПЛИВ ОЛІГОЕФІРІВ НА NO-СИНТАЗНУ І МОНООКСИГЕНАЗНУ ОКИСЛЮВАЛЬНУ СИСТЕМУ В УМОВАХ ТРИВАЛОЇ ТОКСИФІКАЦІЇ ЩУРІВ**

Метою роботи було визначення тривалого субтоксичного впливу олігоєфірів марок Л-3603-2-12 і Л-10002-2-80 на стан NO-синтазної окислювальної і монооксигеназної гідроксилуючої системи та внутрішньоклітинний медіаторний циклазний каскад в умовах підгострого токсикологічного експерименту. Результати роботи дозволяють судити, що досліджувані олігоєфіри в дозі 1/10 та 1/100 ДЛ<sub>50</sub> активують NO-синтазну окислювальну систему, вільнорадикальні процеси і ПОЛ. Експериментальні дані свідчать, що активація NO-синтазної окислювальної системи супроводжується накопиченням значної кількості NO, NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub>, s-нітрозолів, аміаку.

**Ключові слова:** олігоєфіри, NO-синтазна окислювальна система, монооксигеназна гідроксилуюча системи, токсичність, ксенобіотики.

Антропогенна діяльність людини на сучасному етапі розвитку суспільства, науки і техніки призвела до накопичення в біосфері великої маси хімічних сполук, яким в різній мірі властива біологічна активність. Безконтрольне використання хімічних речовин, до яких еволюційно тваринний світ не адаптований, може мати невиправні наслідки. Існують численні приклади інтенсивного забруднення виробничих територій, водойм, ґрунту, що тісно поєднані з формуванням екологічно обумовлених патологічних станів і захворювань. Стрімкий розвиток хімічної, нафтопереробної, металургійної, фармацевтичної та машинобудівної промисловості, інтенсифікація сільського господарства та використання в побуті великого асортименту хімічних засобів створює загрозу глобального забруднення навколишнього середовища, що створює як потенційну, так і реальну загрозу для здоров'я населення [1]. Це повною мірою стосується і промисловості органічного синтезу олігоєфірів, які за масштабами світового виробництва посідають друге місце після поверхнево-активних речовин [2]. Механізми біологічної дії багатьох хімічних груп ксенобіотиків більш-менш вивчені, проте у зв'язку з науково-технічним прогресом кожного року з'являються нові хімічні сполуки, які потребують ретельної прогностичної оцінки їх потенційної небезпеки для флори і фауни. До таких ксенобіотиків відносяться олігоєфіри з товарною назвою «Лапроли» марок Л-3603-2-12 (поліоксипропіленоксietiлентріол молекулярної маси 3600) і Л-10002-2-80 (поліоксietiленипропілендіол молекулярної маси 10000). Олігоєфіри даних марок широко застосовуються в різних галузях народного господарства для отримання на їх основі пластмас, пінопластів, лаків, епоксидних смол, гідравлічних, охолоджуючих та гальмівних рідин, антикорозійних препаратів, емульгаторів та ін. Великі обсяги виробництва, широкий контакт з населенням та відсутність прогностичної характеристики потенційної небезпеки визначили необхідність всебічного вивчення механізмів їх біологічної дії, що є актуальною медико-біологічною проблемою. Визначення структурно-метаболическої перебудови, яка виникла внаслідок надходження до організму хімічних патогенів, дозволяє розкрити патохімічні ланцюги порушення всіх органів, систем і функцій організму та розробити метаболическо-адаптовану корекцію втрачених функцій [1, 2]. Останнім

часом велику увагу привертає до себе обмін оксиду азоту як біологічно активного поліфункціонального регулятора великої кількості метаболічних процесів, але дані про метаболізм NO-синтазної системи в умовах токсифікації ксенобіотиками в сучасній науковій літературі практично відсутні. Але відомо, що газоподібний хімічний медіатор NO відіграє універсальну роль у регуляції фізіологічних функцій систем організму як у нормі, так і при патологічних станах. В організмі NO синтезується із амінокислоти L-аргініну. Цей процес представляє собою комплексну окислювальну реакцію. Вона каталізується ферментом NO-синтазою (NOS) і приєднує молекулярний кисень до кінцевого атому азоту в гуанідиновій групі L-аргініна [3, 4]. На сьогодні ідентифіковано три ізоформи NOS, які каталізують утворення NO [4]. NO передає сигнал з рецепторів мембран на внутрішньоклітинні структури, беручи участь у формуванні міжклітинного молекулярного зв'язку та підтримці внутрішньоклітинного метаболізму. Ця молекула впливає на судинний тонус, секрецію медіаторів і гормонів, нейротрансмісію. Водночас вона є потенційно токсичною молекулою, рівень якої зростає при багатьох патологічних станах і захворюваннях [5, 6]. Механізм дії всіх ізоферментів подібний: кальцій під впливом нейромедіаторних стимулів входить в клітину, де зв'язується в цитозолі в єдиний комплекс з кальмодуліном. Комплекс Ca-кальмодулін виступає як кофактор і активує NOS і продукцію оксиду азоту. Останній, в свою чергу, активує клітинний фермент гуанілатциклазу (ГЦ), що призводить до утворення циклічного гуанозинмонофосфата (цГМФ), який опосередковує всі ефекти NO. Поліфункціональність NO як регулятора структурно-метаболічних процесів робить актуальним дослідження його рівнів і стану NO-синтазної окислювальної системи в умовах тривалого субтоксичного впливу на організм ксенобіотиків.

Метою роботи було визначення тривалого субтоксичного впливу олігоефірів на стан NO-синтазної окислювальної і монооксигеназної гідроксилуючої системи та внутрішньоклітинний медіаторний циклазний каскад в умовах підгострого токсикологічного експерименту.

Як ксенобіотики були використані нові марки олігоефірів товарною назвою «Лапроли» Л-3603-2-12 (поліоксипропіленоксиетилентріол молекулярної маси 3600) і Л-10002-2-80 (поліоксиетиленоксипропілендіол молекулярною масою 10000). Експериментальна частина роботи виконана на 70 статевозрілих білих щурах популяції Вістар масою 180–200 г. Тварини натще вранці за допомогою металевого зонду перорально отримували водні розчини олігоефірів в дозах 1/10, 1/100 і 1/1000 ДЛ<sub>50</sub>. Середньолетальна доза (ДЛ<sub>50</sub>) була встановлена на білих щурах на рівні 3,34 і 38,4 г/кг маси тварин [1, 2]. Тривалість підгострої токсифікації становила 45 діб. В кожній групі – контрольній і експериментальних – нараховувалося по 10 тварин. При виконанні дослідних робіт дотримувалися біоетики і Закону України «Про захист тварин від жорсткого поводження» від 21.02.2006 № 3477-IV. Програма дослідження NO-синтазної метаболічної системи передбачала дослідження вмісту в сироватці крові аміаку (NH<sub>3</sub>), нітритів (NO<sub>2</sub>), нітратів (NO<sub>3</sub>), S-нітрозотіолу, ендотеліальної (eNOS), індубібельної NO-синтази (iNOS) відповідно до методичних вказівок МОЗ України «Діагностика ендотеліальної функції – оцінка вазоактивного пулу оксиду азоту» [7]. Для більш об'єктивного аналізу ендотеліальної дисфункції додатково визначалася динаміка метгемоглобіну в крові, цитруліну і аргініну в плазмі крові, активність аденілат- і гуанілатциклазного каскаду, НАДФН-диафоридази в печінці. Концентрацію метгемоглобіну визначали за допомогою спектрофотометра СФ-46 за Горном [8]. Вміст амінокислот аргініну і цитруліну досліджували методом іонообмінної хроматографії на автоматичному аналізаторі амінокислот ААА-339 (Чехія). Стан і активність аденілат- і гуанілат-циклазної системи визначали радіолігандним методом в препаратах мембран гепатоцитів білих щурів за рівнем аденілатциклази, гуанілатциклази, циклічного аденозинмонофосфата (цАМФ), циклічного гуанозинмонофосфата (цГМФ), фосфодіестерази (ФДЕ) і за величиною поглинання <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> мембранними фракціями, для оцінки яких використовували набір реагентів і стандартні методики фірми Amersham International (Великобританія) [9].

Відомо, що NOS, як напівфункціональна оксидоредуктаза за своїми властивостями і функціями близька до цитохрому P<sub>450</sub> і цитохрому P<sub>450</sub>-редуктазі [10]. Це дозволило нам вивчити стан монооксигеназної системи мікросом ендоплазматичного ретикулу гепатоцитів і екстраполювати ці результати на NO-синтазну активність. Стан мікросомального окислення оцінювали за дихальною і ферментативною активністю, вміст цитохромів b<sub>5</sub> і P<sub>450</sub> визначили за методом Т. Отича, R. Sato [11] за допомогою спектрофотометра «Specord UV VIS». Статистичне опрацювання отриманих результатів виконували з використанням критерію Стьюдента-Фішера.

Результати дослідження показали, що олігоефіри значно підвищували в сироватці крові вміст NH<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub>, S-нітрозотіолу, метгемоглобіну, активність ферментів - eNOS, iNOS, L-цитруліну і знижували вміст L-аргініну. Так, NO<sub>2</sub> у груп тварин, токсифікованих 1/10 і 1/100 ДЛ<sub>50</sub>, під впливом Л-3603-2-12 відповідно підвищувалося на 136,29 % і 82,25 %. «Лапрол» Л-10002-2-80 у цих дозах підвищував NO<sub>2</sub> на 119,35 % і 56,45 %. Нітрати під впливом Л-3603-2-12 в групах тварин, на яких діяли 1/10 і 1/100 ДЛ<sub>50</sub>, відповідно зростали на 98,30 % і 51,27 %. Менш виражене зростання спостерігалось під впливом Л-10002-2-80 (на 79,23 % і 21,18 %, відповідно у груп, токсифікованих 1/10 і 1/100 ДЛ<sub>50</sub>). На фоні підвищення NO<sub>2</sub> і NO<sub>3</sub> відмічалось зростання NH<sub>3</sub> в сироватці крові (на 139,60 % і 87,12 %, та 128,71 % і 74,35 % відповідно під впливом Л-3603-2-12 і Л-10002-2-80). Олігоефір Л-3603-2-12 призводив до підвищення S-нітрозотіолу на 204,16 % і 133,33 %, активності eNOS на 100 % і 85,7 %, iNOS на 300 % і 195,23 %, L-цитруліну на 107 % і 67,51 % (відповідно під впливом 1/10 і 1/100 ДЛ<sub>50</sub>). Даний ксенобіотик знижував L-аргінін в плазмі крові на 62,5 % і 45,17 % у груп щурів, токсифікованих 1/10 і 1/100 ДЛ<sub>50</sub>. Аналіз показує, що ці зміни супроводжуються значним зростанням метгемоглобіну в крові (табл. 1). Аналогічна динаміка S-нітрозотіолу, eNOS, iNOS, метгемоглобіну, L-аргініну і L-цитруліну була властива і групам тварин, що були токсифіковані Л-10002-2-80. Дослідження свідчать, що олігоефіри, як в дозі 1/10, так і в дозі 1/100 ДЛ<sub>50</sub>, призводять до накопичення продуктів окислювальної модифікації оксиду азоту. Отримані результати можуть вказувати на активацію оксидативних процесів, що пов'язані з окислювальною перебудовою білків (у тому числі гемоглобіну і тіолвмісних субстратів). Критеріально значимими показниками, які відображують стан NO-синтазної окислювальної системи, можна вважати активність індукцибельної iNOS і вміст S-нітрозотіолів як для Л-3603-2-12, так і для Л-10002-2-80. В дозі 1/1000 ДЛ<sub>50</sub> олігоефіри не впливали на NO-синтазну окислювальну систему (у порівнянні з групою контрольних тварин, які отримували питну воду).

**Таблиця 1 – Вплив олігоефірів на стан NO-синтазної окислювальної системи при тривалій токсифікації щурів**

Показники	Група спостереження, ДЛ <sub>50</sub> М±m						
	Контроль	Л-3603-2-12			Л-10002-2-80		
		1/10	1/100	1/1000	1/10	1/100	1/1000
NO <sub>2</sub> (мкмоль/л)	12,4±1,9	29,3±1,6*	22,6±1,7*	13,7±1,4	27,2±1,8*	19,4±1,5*	11,8±1,5
NO <sub>3</sub> (мкмоль/л)	23,6±1,7	46,8±2,7*	35,7±1,8*	22,8±1,9	42,3±2,5*	28,6±1,4*	24,2±1,8
NH <sub>3</sub> (нмоль/л)	20,2±1,5	48,4±3,1*	37,8±2,1*	19,5±1,6	46,2±2,9*	35,3±1,9*	19,7±1,7
s-нітрозотіол (ммоль/л)	0,24±0,03	0,73±0,06*	0,56±0,04*	0,25±0,04	0,68±0,04*	0,52±0,05*	0,26±0,05
eNOS (пмоль/хв• мг білка)	0,49±0,05	0,98±0,07*	0,91±0,06*	0,50±0,06	0,94±0,08*	0,84±0,07*	0,51±0,05
iNOS (пмоль/хв• мг білка)	0,21±0,03	0,84±0,05*	0,62±0,05*	0,22±0,03	0,77±0,06*	0,57±0,06*	0,20±0,04
метгемоглобін (нмоль/мл)	0,32±0,017	17,4±1,35*	9,67±0,83*	0,33±0,025	15,6±1,27*	8,42±0,77*	0,31±0,022
L-аргінін (нмоль/мл)	24,8±1,35	9,3±0,86*	13,6±1,24*	23,9±1,65	11,5±1,17*	14,8±1,35*	23,7±1,58
L-цитрулін (нмоль/мл)	15,7±1,42	32,5±1,87*	26,3±1,54*	16,3±1,27	29,6±1,7*	24,5±1,43*	15,8±1,37

Примітка: \* - різниця вірогідності p<0,05 у порівнянні з контролем.

Дослідження механізмів NO-ергічної медіаторної системи виявили зниження цАМФ на 45,73 % і 21,83 %, а також підвищення цГМФ на 86,55 % і 73,84 % відповідно під впливом Л-3603-2-12 і Л-10002-2-80. Ці дані добре узгоджуються з активністю ферментів аденілат- і гуанілатциклази.

Так аденілатциклаза знижувалася на 86,56 % і 80,11 %, а гуанілатциклазна активність зростала на 114,38 % і 82,01 % у груп тварин, токсифікованих Л-3603-2-12 і Л-10002-2-80 відповідно. Активність фосфодіестерази зростала на 140,15 % і 125,75 % під впливом 1/100 ДЛ<sub>50</sub> Л-3603-2-12 і Л-10002-2-80. На цьому фоні спостерігалось підвищення поглинання іонів Ca<sup>2+</sup> мембранними фракціями гепатоцитів на 99,61 % і 81,79 %, відповідно під впливом Л-3603-2-12 і Л-10002-2-80.

**Таблиця 2 – Вплив олігоєфірів на стан циклазного медіаторного каскаду гепатоцитів під впливом 1/100 ДЛ<sub>50</sub>**

Показники	Група спостереження, M±m		
	Контроль	Л-3603-2-12	Л-10002-2-80
цАМФ	174,3±7,9	94,6±5,84*	125,8±7,12*
цГМФ	123,5±5,8	230,4±8,25*	214,7±9,42*
АЦ (нмоль цАМФ мг білка 1 хв)	1,86±0,12	0,25±0,012*	0,37±0,022*
ГЦ (нмоль цГМФ мг білка 1 хв)	1,39±0,08	2,98±0,16*	2,53±0,24*
ФДЕ (фмоль/ мг білка 1 хв)	1,32±0,07	3,17±0,27*	2,98±0,21*
Поглинання <sup>45</sup> Са <sup>2+</sup> (імп/ хв• мг білка)	3154,8±63,7	6297,6±82,5*	5735,4±82,4*

Примітка: \* - різниця вірогідності p<0,05 у порівнянні з контролем.

Дослідження оціночних показників демонструє, що ксенобіотики активують у дозі 1/100 ДЛ<sub>50</sub> відновлювальні синтези, які можна розглядати як захисно-приспосувальну реакцію на ушкоджуючу дію ксенобіотиків і продуктів вільнорадикального та перекисного окислення ліпідів. Дослідження впливу олігоєфірів у дозі 1/10 ДЛ<sub>50</sub> на мікросомальну монооксигеназну систему гепатоцитів повністю підтверджує нашу думку.

Так, ксенобіотик Л-3603-2-12 в умовах токсифікації тварин у дозі 1/10 ДЛ<sub>50</sub> підвищував о-диметилазну активність на 270,84 %, НАДФН-цитохром С редуктазну активність – на 68,38 %. При цьому швидкість ендogenousного дихання зростала на 214,18 %, швидкість окислення НАДФН – на 114,33 %, швидкість окислення НАДФН в присутності ЕДТА – на 73,85 % і швидкість перекисного окислення ліпідів – на 408,10 %.

Аналогічна динаміка оціночних показників спостерігалася і під впливом Л-10002-2-80, проте була менш виражена.

Вміст цитохрому Р450 підвищувався на 165,28 % і 146,72 %, а цитохрому b5 – на 171,12 % і 151,76 % у груп тварин, токсифікованих Л-3603-2-12 і Л-10002-2-80 відповідно.

Дані дослідження монооксигеназної системи вказують, що олігоєфіри активують всі процеси знешкодження ксенобіотиків, які супроводжуються накопиченням активних форм кисню і продуктів ПОЛ. Будучи активними метаболізерами монооксигеназної системи мікросом гепатоцитів, олігоєфіри є потенційно безпечними сполуками в аспекті розвитку можливих віддалених наслідків в умовах їх тривалої токсифікації внаслідок індукції вільнорадикальних процесів і ПОЛ.

**Таблиця 3 – Вплив олігоєфірів у дозі 1/10 ДЛ<sub>50</sub> на показники мікросомальної монооксигеназної системи гепатоцитів печінки білих щурів при тривалій токсифікації**

Показники	Група тварин, М±m		
	Контроль	Л-3603-2-12	Л-10002-2-80
О-деметилаза (нмоль р-нітрофенола/ хв• мг білка)	6,71±0,57	24,83±1,15*	21,62±1,38*
НАДФН-цитохром С редуکتаса (нмоль цитохрома С / хв • мг білка)	205,4±16,3	365,4±12,7*	353,7±10,3*
НАДН-цитохром С редуکتаса (нмоль цитохрома С / хв • мг білка)	963,7±57, 2	1574,5±21,36*	1482,7±25,53*
Швидкість ендogenousного дихання (нмольО <sub>2</sub> )	1,48±0,12	4,65±0,48*	4,23±0,46*
Швидкість окислення НАДФН (нмольО <sub>2</sub> )	3,14±0,28	6,73±0,54*	6,47±0,52*
Швидкість окислення НАДФН в присутності ЕДТА (нмольО <sub>2</sub> )	2,83±0,40	4,92±0,57*	4,38±0,44*
Швидкість перекисного окислення ліпідів (ПОЛ)	0,37±0,02	1,88±0,12*	1,73±0,13*
Вміст цитохрому Р450 (нмоль / мг білка)	0,916±0,05	2,43±0,17*	2,26±0,20*
Вміст цитохрому b5 (нмоль / мг білка)	0,568±0,02	1,54±0,08*	1,43±0,09*

Примітка: \* - різниця вірогідності  $p < 0,05$  у порівнянні з контролем.

## ВИСНОВКИ

Результати роботи свідчать про те, що олігоєфіри Л-3603-2-12 і Л-10002-2-80 в дозі 1/10 та 1/100 ДЛ<sub>50</sub> активують NO-синтазну окислювальну систему, вільнорадикальні процеси і ПОЛ. Дослідження дозволяють зробити висновок про те, що активація NO-синтазної окислювальної системи супроводжується накопиченням значної кількості NO, NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub>, s-нітрозолів, аміаку.

Ці дані вказують на ендogenousну інтоксикацію і підвищення активних форм кисню, які є провідним ланцюгом формування молекулярної мембранної патології. Аналіз показує, що олігоєфіри активують NO-ергічну медіаторну систему в дозі 1/100 ДЛ<sub>50</sub>, яка приводить до зміни внутрішньоклітинного метаболізму. Це може свідчити про захисно-приспосувальну реакцію на ушкоджуючі дії ксенобіотиків, продуктів вільнорадикального окислення і ПОЛ.

Такий висновок підтверджується і активацією мікросомальної монооксигеназної системи гепатоцитів під впливом олігоєфірів Л-3603-2-12 і Л-10002-2-80 в дозі 1/10 ДЛ<sub>50</sub>.

Оскільки олігоєфіри відіграють роль активаторів монооксигеназної системи детоксикації, вони є потенційно безпечними ксенобіотиками в аспекті розвитку можливих віддалених наслідків (мутагенеза, канцерогенеза, атерогенеза та ін.). У дозі 1/1000 ДЛ<sub>50</sub> олігоєфіри Л-3603-2-12 і Л-10002-2-80 не впливають на показники окислювального метаболізму в умовах тривалої субтоксичної дії.

## Бібліографічний список

1. Биохимические механизмы радиомиметических эффектов поверхностно-активных веществ / Н. Г. Щербань, В. И. Жуков, В. В. Мясоєдов и др. – Х. : Раритеты Украины, 2012. – 120 с.

2. Цыганенко А. Я. Научные основы обоснования прогноза потенциальной опасности детергентов в связи с регламентацией в воде водоемов / А. Я. Цыганенко, В. И. Жуков, Н. Г. Щербань и др. – Белгород, 2001. – 442 с.
3. Moncada S. Mechanisms of disease: the L-arginine-nitric oxide pathway / S. Moncada, A. Higgs // *New Engl. J. Med.* – 1993. – Vol. 329. – P. 2002–2012.
4. Жуков В. І. NO-залежні механізми токсичності синтетичних детергентів / В. І. Жуков, В. В. М'ясоєдов // *Вісник проблем біології і медицини.* – 2002. – № 9-10. – С. 12–21.
5. Гуревич К. Г. Оксид азота: биосинтез, механизмы действия, функция / К. Г. Гуревич, Н. Л. Шимановский // *Вопросы биологии, медицины и фармацевтической химии.* – 2000. – № 4. – С. 16–21.
6. Зайцева О. В. Состояние активности NO-синтазы и содержание оксида азота у больных псориазом / О. В. Зайцева, В. І. Жуков, Е. А. Броше // *Вісник проблем біології і медицини.* – 2002. – № 1. – С. 80–85.
7. Діагностика ендотеліальної функції – оцінка вазоактивного пулу оксиду азота. Методичні рекомендації МОЗ України. – К., 2007. – 20 с.
8. Горн Л. Э. К методике количественного определения метгемоглобина в крови / Л. Э. Горн // *Лабораторное дело.* – 1951. – № 4, т. XIV. – С. 12–14.
9. Романенко В. Д. Физиология кальциевого обмена / В. Д. Романенко. – К. : Наукова думка, 1975. – 264 с.
10. Nussler A. K. Stimulation of the nitric oxide synthase pathway in human hepatocytes by cytokines and endotoxin / A. K. Nussler, M. Di Silvio, T. R. Billiar et al. // *J. Exp. Med.* – 1992. – Vol. 176. – P. 261–264.
11. Omura T. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsoms / T. Omura, R. Sato // *J. Biol. Chem.* – 1964. – V. 239. – № 7. – P. 2379–2385.