

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

СТАН АНТИРАДИКАЛЬНОГО, АНТИПЕРЕКИСНОГО ЗАХИСТУ ПІД ВПЛИВОМ ТРИВАЛОЇ СУБТОКСИЧНОЇ ДІЇ ОЛІГОЕФІРА Л-3603-2-12

Було визначено субтоксичні дози Л-3603-2-12 на вільнорадикальні процеси, перекисне окислення ліпідів і систему антиоксидантного захисту в умовах підгострого токсикологічного експерименту на білих щурах та обґрунтування діючої, порогової і недіючої дози як прогностичної основи безпечності ксенобіотика. В дозі 1/10 ДЛ₅₀ ксенобіотик значно пригнічує ферментативну і неферментативну систему антиоксидантного захисту, що призводить до розвитку дистрофічних процесів і зриву захисно-приспосувальних механізмів. Аналіз показує, що 1/10 ДЛ₅₀ є діючою дозою, 1/100 ДЛ₅₀ – пороговою, а 1/1000 ДЛ₅₀ – недіючою, що є прогностично значимим для оцінки потенційної безпечності олігоєфіра Л-3603-2-12.

Ключові слова: антирадикальний захист, антиперекисний захист, олігоєфіри, «Лапроли», токсичність, ксенобіотики.

Вивчення впливу негативних факторів навколишнього середовища на організм теплокровних тварин обумовлено необхідністю оцінки прогнозу потенційної безпеки і розробки заходів, спрямованих на підвищення загальної неспецифічної резистентності та покращення здоров'я населення. Це потребує подальшого дослідження механізмів формування патологічних станів і захворювань при взаємодії людини з шкідливими факторами навколишнього середовища [1].

Багаточисельні дослідження свідчать, що тривала субтоксична дія ксенобіотиків на організм може супроводжуватися імунобіологічною недостатністю, дисфункцією нервової і ендокринної систем, розладами системи травлення і порушеннями обміну речовин і енергії [1–3]. Відомо, що значній кількості хімічних сполук властиві мембранотропні ефекти, які супроводжуються активацією вільнорадикальних процесів (ВРП) і перекисного окислення ліпідів (ПОЛ).

Проте тривала дія на організм стимуляторів ВРП і ПОЛ здатна пригнічувати, а згодом і виснажувати систему антирадикального і антиперекисного захисту, що супроводжується формуванням молекулярної-мембранної патології [4, 5], яка є провідним ланцюгом розвитку віддалених наслідків. У тому числі – мутагенеза, канцерогенеза, тератогенеза, імунологічної недостатності, атерогенеза та ін. [1–3]. Поряд з тим необхідно відмітити, що патохімічні механізми розвитку структурно-метаболічних порушень при дії на організм багатьох хімічних сполук залишаються маловивченими або зовсім невивченими. Це в повній мірі відноситься і до нового олігоєфіру товарної марки «Лапрол» Л-3603-2-12, який знайшов широке впровадження у різних галузях народного господарства для отримання пластмас, епоксидних смол, лаків, поліуретанів, гідравлічних, охолоджуючих і гальмівних рідин і ін. [2].

Відсутність в науковій літературі свідчень про механізми біологічної дії даного ксенобіотика та прогностичної характеристики потенційної безпечності визначили актуальність даного дослідження.

Метою роботи було визначення впливу субтоксичних доз Л-3603-2-12 на вільнорадикальні процеси, перекисне окислення ліпідів і систему антиоксидантного захисту в умовах підгострого токсикологічного експерименту на білих щурах та обґрунтування діючої, порогової і недіючої дози як прогностичної основи безпечності ксенобіотика.

У роботі використовувався новий олігоєфір товарної марки «Лапрол» Л-3603-2-12 (поліоксипропіленоксиетилентріол) з регламентованими фізико-хімічними властивостями, молекулярною масою 3600, добре розчинний у воді і органічних розчинниках. За агрегатним станом є прозорою рідиною світло-жовтого кольору, питома щільність при 25 °С (г/см^3) – 1,03; рН (метанол : вода=70:30) – 6,5–7,5; функціональність – 3; температура спалаху – 200 °С; кислотне число (мг КОН/г) не більше 0,2. На підставі результатів гострої токсичності відноситься до помірно токсичних речовин (3 клас безпеки), що не мають кумулятивних властивостей. Середньолетальна доза (ДЛ_{50}) за даними параметрів гострої токсичності для білих щурів і мишей була встановлена на рівні 3,34 і 2,80 г/кг маси тварин [2]. Програма дослідження передбачала проведення підгострого токсикологічного експерименту на статевозрілих щурах популяції Вістар масою 180–200 г. Відповідно до умов експерименту тваринам натще вранці упродовж 45 днів щоденно внутрішньошлунково вводилися (за допомогою металевого зонду) водні розчини Л-3603-2-12 із розрахунку 1/10, 1/100 і 1/1000 ДЛ_{50} . Контрольна група тварин отримувала відповідні об'єми питної води. В експерименті використовувалися 40 щурів (по 10 в кожній групі), дотримувалися принципи біоетики і «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які застосовуються для експериментальних і інших наукових цілей». – Страсбург, 1985. Після завершення підгострої токсифікації тварин, стан оксидантних і антиоксидантних процесів оцінювався за такими показниками, як: малоновий діальдегід (МДА), дієнові кон'югати (ДК); сульфгідрильні групи (SH-групи), відновлений глутатіон (Г-SH); гаптоглобін, церулоплазмін (ЦП), каталаза, пероксидаза, глутатіонпероксидаза (ГП), супероксиддисмутаза (СОД); вітамін Е і С [1–5]. Визначення ДК в сироватці крові здійснювалося спектрофотометричним методом, який заснований на тому, що первинні продукти ПОЛ мають характерне поглинання в УФ-області спектра з максимумом 233 нм [6, 7]. МДА визначався спектрофотометричним методом, який заснований на здатності при нагріванні з 2-тіобарбітуровою кислотою утворювати зафарбований комплекс з максимумом поглинання при довжині хвилі 533 нм [8, 9]. Активність каталази оцінювалася за швидкістю утилізації H_2O_2 із інкубаційного середовища в кольоровій реакції з молібдатом амонія спектрофотометричним методом [10]. Активність пероксидази визначалася за швидкістю реакції окислення *p*-фенілендіаміна перекисом водню [11]. Глутатіонпероксидаза визначалася за зниженням відновленого глутатіону в кольоровій реакції на сульфгідрильні групи з реактивом Елмана спектрофотометрично при $\lambda=412$ нм [12]. СОД крові визначалася спектрофотометричним методом за ступенем пригнічення відновлення нітросинього тетразолію [1, 3, 14, 15]. Відновлений глутатіон в крові з реактивом Елмана визначався спектрофотометричним методом, який полягає в тому, що реактив Елмана в реакції тіолдисульфідного обміну легко відновлюється SH-субстратами, утворюючи забарвлений у жовтий колір продукт – тіонітробензоат $\lambda_{\text{max}}=412$ нм [16, 17]. Церулоплазмін в сироватці крові визначався за методом Равін [18]. Сульфгідрильні групи в крові визначалися за допомогою реактиву Елмана спектрофотометричним методом [16, 17]. Вітамін Е визначався спектрофотометрично після попередньої екстракції методом колонної хроматографії в реакції окислення азотною кислотою до забарвлених в червоно-рожевий колір продуктів хіноїдного ряду ($\lambda_{\text{max}}=470$ нм) [19, 20]. Аскорбінова кислота в наднирниках визначалася титриметричним методом з реактивом Тільманса [20, 21]. Статистичне опрацювання отриманих результатів виконували з використанням критерію Стьюдента-Фішера.

Результати дослідження перекисного окислення ліпідів у груп тварин, що піддавалися токсифікації 1/10 і 1/100 ДЛ_{50} Л-3603-2-12 було виявлено підвищення в

сироватці крові вмісту малонового діальдегіду і дієнових кон'югатів (табл. 1). Ці дані вказують на активацію ПОЛ, яка супроводжується накопиченням первинних продуктів вільнорадикального окислення ліпідів – гідроперекисів поліненасичених жирних кислот, що мають в структурі поєднані дієни і вторинний продукт ПОЛ – малоновий діальдегід. Первинні продукти ПОЛ (ДК) підвищувалися на 162,90 % і 76,26 %, а вторинні (МДА) - на 266,61 % і 95,86 %, відповідно під впливом 1/10 і 1/100 ДЛ₅₀. Високі рівні ДК і МДА дають можливість судити і про підвищення кінцевих продуктів ПОЛ, якими є флуоресціюючі субстрати окислювальної сополімерізації ліпідів і білків – шиффові основи [4–6]. Відновлений глутатіон в крові підвищувався на 35 % під впливом 1/100 ДЛ₅₀ і знижувався на 55 % у щурів, токсифікованих 1/10 ДЛ₅₀.

Ці дані вказують, що Л-3603-2-12 в субтоксичній дозі 1/100 ДЛ₅₀ стимулює відновлювальні синтези (така реакція може розглядатися, як захисно-приспосувальна), тоді як в групах токсифікованих тварин 1/10 ДЛ₅₀ спостерігається зрив таких механізмів [1, 2]. Діагностика вільних сульфгідрильних груп виявила зменшення їх вмісту під впливом 1/100 ДЛ₅₀ на 42,42 % і збільшення у групи щурів, токсифікованих 1/10 ДЛ₅₀ на 59,70 %. На думку багатьох авторів, зменшення вмісту SH-груп в крові пов'язано з використанням їх для відновлювальних синтезів, тоді як збільшення концентрації може бути поєднано з підвищенням процесів розпаду білків, амінокислот (у тому числі ферментів), що свідчить про перевагу катаболізму над анаболізмом [1–3]. Оцінка вмісту вітаміну Е виявила зменшення його концентрації в сироватці крові на 30,65 % і 49,93 % відповідно під впливом 1/10 і 1/100 ДЛ₅₀.

Зовсім інша динаміка була властива вітаміну С в наднирниках: 1/100 ДЛ₅₀ забезпечувала підвищення його вмісту на 66,29 %, а 1/10 ДЛ₅₀ пригнічення на 41,86 %. Аналіз показує, що 1/100 ДЛ₅₀ стимулює захисно-приспосувальні механізми забезпечення гомеостатичної функції організму, а 1/10 ДЛ₅₀ призводить до їх зриву і супроводжується дистрофічними і деструктивними процесами.

Таблиця 1 – Вплив олігоєфіра Л-3603-2-12 на перекисне окислення ліпідів і систему антирадикального антиперекисного захисту в умовах тривалої токсифікації

Показники	Група спостереження, ДЛ ₅₀ M±m			
	Контроль	1/10	1/100	1/1000
МДА (мкмоль/л), сироватка	12,1±1,3	44,36±3,15*	23,7±1,8*	13,5±1,44
ДК (мкмоль/л), сироватка	33,7±2,8	88,6±4,77*	59,4±4,2*	31,7±2,65
Г- SH (ммоль/л), кров	1,6±0,14	0,72±0,05*	2,16±0,19*	1,55±0,17
SH-групи (ммоль/л), кров	27,3±1,56	43,6±3,14*	15,72±1,42*	26,4±1,62
Вітамін Е (мкмоль/л), сироватка	26,4±1,75	13,22±0,95*	18,31±1,54*	24,23±1,56
Вітамін С (мг %), наднирники	17,8±1,63	10,35±0,86*	29,6±1,83*	18,54±1,43
Церулоплазмін, (мкмоль/л)	2,46±0,15	1,23±0,07*	4,35±0,32*	2,37±0,26
СОД (мкат/мг•Hb), кров	0,39±0,06	0,18±0,02*	0,92±0,07*	0,37±0,04
Каталаза (мкат/г•Hb), кров	4,92±0,44	3,17±0,21*	7,56±0,65*	4,85±0,42
Пероксидаза (мкат/г•Hb), кров	7,83±0,67	4,26±0,33*	13,82±1,24*	7,26±0,77
Глутатіонпероксидаза (мкат/г•Hb), кров	6,28±0,53	3,76±0,25*	9,75±0,83*	6,38±0,49
Гаптоглобін (г/л), сироватка	1,72±0,14	0,85±0,07*	3,45±0,27*	1,65±0,17

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

Оцінка активності ферментів антирадикального і антиперекисного захисту виявила підвищення під впливом 1/100 ДЛ₅₀ церулоплазміну, СОД, каталази, пероксидази і глутатіонпероксидази відповідно на 76,83 %, 135,89 %, 53,65 %, 76,5 %

і 55,25 %, що вказує на мобілізацію захисно-приспосувальних механізмів антирадикального і антиперекисного захисту. В дозі 1/10 ДЛ₅₀ Л-3603-2-12 знижував активність церулоплазміну, СОД, каталази, пероксидази і глутатіонпероксидази, відповідно на 50 %; 53,85 %; 35,57 %; 45,60 % і 40,13 %, що вказує на виснаження системи антиоксидантного захисту.

Аналогічна динаміка вмісту в сироватці крові відмічалася і у гаптоглобіну: в 1/100 ДЛ₅₀ ксенобіотик підвищував гаптоглобін на 100,58 %, а в 1/10 ДЛ₅₀ ці процеси були значно пригнічені (пов'язано це, перш за все, із дистрофічними процесами у печінці). Ці дані добре узгоджуються з динамікою активності ферментів і субстратів (SH-групи, глутатіон, вітамін С, Е) антиоксидантного захисту.

ВИСНОВКИ

Результати дослідження свідчать, що Л-3603-2-12 в дозах 1/10 і 1/100 ДЛ₅₀ стимулює накопичення в організмі теплокровних тварин первинних (ДК), вторинних (МДА) і кінцевих продуктів вільнорадикальних процесів і ПОЛ.

Олігоефір у дозі 1/100 ДЛ₅₀ активує систему антирадикального і антиперекисного захисту, підвищує вміст вільного глутатіону, вітаміну С, гаптоглобіну, церулоплазміну та активність ферментів СОД, каталази, пероксидази і глутатіонпероксидази, що свідчить про значне напруження захисно-приспосувальних антирадикальних і антиперекисних механізмів.

У дозі 1/10 ДЛ₅₀ ксенобіотик значно пригнічує ферментативну і не ферментативну систему антиоксидантного захисту, що призводить до розвитку дистрофічних процесів і зриву захисно-приспосувальних механізмів. Аналіз показує, що 1/10 ДЛ₅₀ є діючою дозою, 1/100 ДЛ₅₀ – пороговою, а 1/1000 ДЛ₅₀ – недіючою, що є прогностично значимим для оцінки потенційної безпечності олігоефіра Л-3603-2-12.

Бібліографічний список

1. Биохимические механизмы радиомиметических эффектов поверхностно-активных веществ / Н. Г. Щербань, В. И. Жуков, В. В. Мясоедов и др. – Х. : Раритеты Украины, 2012. – 120 с.
2. Простые и макроциклические эфиры: научные основы охраны водных объектов / В. И. Жуков, Л. Д. Попова, О. В. Зайцева и др. – Х. : Торнадо, 2000. – 438 с.
3. Детергенты – модуляторы радиомиметических эффектов / В. И. Жуков, В. В. Мясоедов, Ю. И. Козин и др. – Белгород, 2000. – 376 с.
4. Владимирюв Ю. А. Перекисное окисление липидов в мембранах / Ю. А. Владимирюв, А. И. Арчаков. – М. : Наука, 1972. – 252 с.
5. Бурлакова Е. Б. Измерение свободно-радикальных процессов в тканях животных с привитой опухолью. Физико-химические основы авторегуляции в клетках / Е. Б. Бурлакова, С. К. Добрина, Ю. П. Козлова. – М., 1968. – С. 213–221.
6. Гаврилов Б. В. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови / Б. В. Гаврилов, М. И. Мишкорудная // Лабораторное дело. – 1983. – № 3. – С. 33–36.
7. Косухин А. Б. Экстракция липидов смесью гептан-изопропанол для определения диеновых конъюгатов / А. Б. Косухин, Б. С. Ахметова // Лабораторное дело. – 1987. – № 5. – С. 335–337.
8. Чевари С. Определение антиоксидантных параметров крови и их значение в пожилом возрасте / С. Чевари, Т. Андел, Я. Штрэнгер // Лабораторное дело. – 1991. – № 10. – С. 9–13.
9. Harboe M. A. Method for determination of hemoglobin in plasma by near – ultraviolet spectrophotometry / M. A. Harboe // Scand. J. Clin. Invest. – 1959. – № 11. – P. 66–70.
10. Дубинина Е. Е. Методы определения активности каталазы / Е. Е. Дубинина, С. А. Ефимова, Л. Н. Сафронова // Лабораторное дело. – 1988. – № 8. – С. 16–19.

11. Лошинский А. В. Определение активности ферментов фибринолитической системы с использованием фибриногена, конъюгированного с пероксидазой / А. В. Лошинский, Г. А. Афанасьев, Е. В. Гудков // Лабораторное дело. – 1991. – № 11. – С. 27–31.
12. Мейн М. В. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах / М. В. Мейн // Лабораторное дело. – 1986. – № 12. – С. 724–727.
13. Гуревич В. С. Сравнительный анализ двух методов определения активности СОД / В. С. Гуревич, К. Н. Конторщиков, Л. В. Шатилина // Лабораторное дело. – 1990. – № 4. – С. 44–47.
14. Дубинина Е. Е. Сравнительный анализ активности СОД и каталазы эритроцитов и цельной крови у новорожденных детей при хронической гипоксии / Е. Е. Дубинина // Лабораторное дело. – 1988. – № 8. – С. 16–19.
15. Чевари С. Роль СОД в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологическом материале / С. Чевари // Лабораторное дело. – 1985. – № 11. – С. 678–680.
16. Практикум по биохимии / Под ред. С. Е. Северина, Т. А. Соловьевой. – М. : Изд-во МГУ, 1989. – С. 160–161.
17. Кочетов Т. А. Практическое руководство по энзимологии / Т. А. Кочетов. – М. : Медицина, 1980. – С. 198–217.
18. Мошков К. А. Определение ферментативной активности и иммунореактивности церулоплазмينا в сыворотке крови человека / К. А. Мошков // Лабораторное дело. – 1985. – № 7. – С. 390–395.
19. Бурнусус З. М. Определение α -токоферола в сыворотке крови / З. М. Бурнусус, П. Ф. Сурай, К. Г. Бурнусус // Лабораторное дело. – 1999. – № 4. – С. 49–51.
20. Руководство по методам анализа качества и безопасности пищевых продуктов / Под ред. И. М. Скурихина, В. А. Тутельяна. – М. : Медицина, 1998. – С. 128–130.
21. Руководство к лабораторным работам по биологической химии // Под ред. Т. Г. Березова. – М. : Медицина, 1976. – С. 118–119.