**Андросов Є.Д.1, Резуненко Ю.К.1, Жерновая М.Є.2, Бачинський Р.О.1, Ткаченко А.С.1**

*1Харківський національний медичний університет (м. Харків)*

*2Луганський державний медичний університет (м. Рубіжне)*

**СТАН NO-ОКИСЛЮВАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ У ЩУРІВ ПІД ВПЛИВОМ СУБТОКСИЧНИХ ДОЗ ПОЛІОКСИПРОПІЛЕНГЛІКОЛЮ МОЛЕКУЛЯРНОЇ МАСИ 500**

**Вступ**

В умовах зростаючого антропогенного хімічного навантаження на біосферу актуальною проблемою залишається діагностика гомеостатичної функції організму при донозологічній оцінці структурно-метаболічних порушень, які формуються внаслідок шкідливої дії субтоксичних доз ксенобіотиків. Необхідність визначення патохімічних механізмів розвитку патологічних станів дає можливість для розробки профілактичних заходів і впровадження антидотної терапії. На думку багатьох авторів, значна частина хімічних забруднювачів стимулює вільнорадикальні процеси, перекисне окислення ліпідів і формує розвиток мембранної патології [1, 2]. При цьому, тривала субтоксична дія ксенобіотиків призводить до виснаження системи антирадикального й антиперекисного захисту, що спонукає структурно-метаболічні порушення в біологічних мембранах клітини: ендоплазматичній мережі, плазматичній, мітохондріальній, лізосомальній, ядерній та ін. [3, 4]. Відомо, що найбільш активними структурно-функціональними одиницями в генерації оксидативних процесів виступають мікросомальна гідроксилююча монооксигеназна система гепатоцитів і мітохондріальний дихальний електороннотранспортний ланцюг, які в умовах токсифікації здатні утворювати активні форми кисню й стимулювати накопичення вільних радикалів, перекисів, гідроперекисів. Не виключено, що тривала субтоксична дія нового ксенобіотика – поліоксипропіленгліколю молекулярної маси 500 здатна формувати в організмі розвиток оксидативних процесів і мембранну патологію. Необхідність вивчення впливу поліоксипропіленгліколю на оксидативні процеси обумовлена великими обсягами виробництва, широким застосуванням у різних галузях народного господарства й відсутністю прогностичної характеристики потенційної безпеки для теплокровних тварин та обґрунтування патохімічних механізмів структурно-метаболічних порушень.

*Метою роботи* було вивчення впливу поліоксипропіленгліколю молекулярної маси 500 на вміст оксиду азоту і (NO)-окислювальні процеси під впливом тривалої субтоксичної дії в умовах підгострого токсикологічного експерименту.

**Матеріали  та методи дослідження**

У роботі був застосований поліоксипропіленгліколь молекулярної маси 500 з регламентованими фізико-хімічними властивостями, що має товарну назву «Лапрол» – Л-502-2-10. Даний ксенобіотик за агрегатним станом являє собою в’язку, прозору рідину, добре розчинну у воді, спиртах, бензолі й толуолі. Експериментальна частина роботи була виконана на 40 статевозрілих щурах популяції Вістар масою 180–190 г. Тварини розподілялися на 4 групи: три дослідні й одна контрольна, у кожній по 10 щурів. Відповідно до програми дослідження щоденно, вранці за допомогою металевого зонда щури перорально отримували водні розчини ксенобіотика в 1/10, 1/100 й 1/1000 середньолетальної дози (ДЛ50). Контрольній групі вводилися відповідні об’єми питної води. Тривалість підгострої токсифікації становила 60 діб. При виконанні роботи дотримувалися біоетики й принципів «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986). На основі параметрів гострої токсичності Л-502-2-10 відноситься до помірно токсичних сполук, яким не властиві кумуляція, статева й видова чутливість. ДЛ50 Л-502-2-10 була встановлена на рівнях 1,83 і 2,13 г/кг маси тварин, відповідно для щурів і мишей [5]. Стан окислювальної NО-синтазної системи вивчали у відповідності з методичними рекомендаціями «Діагностика ендотеліальної функції – оцінка вазоактивного пулу оксиду азоту». – МОЗ України, Київ, 2007. – 20 с. При цьому, визначали в сироватці крові вміст нітритів (NO2-), нітратів (NO3-), S-нітрозотіолу й активності ендотеліальної (eNOS) та індуцибельної (iNOS) NO-синтази. З метою оцінки стану NO-залежних механізмів у крові визначали вміст метгемоглобіну за М.С. Кушаковським [6]. У гомогенатах печінки визначали вміст циклічного гуанозинмонофосфату (цГМФ) за допомогою стандартних радіоімунних наборів реагентів фірми «Amersham» (Великобританія), у гепатоцитах – активність гуанілатциклази (ГЦ) відповідно до методичних вказівок [7] і фософодіестарази (ФДЕ) – відповідно до методичних вказівок [8]. У мембранних фракціях мікросом ендоплазматичного ретикулуму гепатоцитів визначали поглинання 45Са2+[9]. У сироватцікрові тварин визначали вміст L-аргініну й L-цитруліну за допомогою автоматичного аналізатору амінокислот ААА-339. Отримані результати були опрацьовані методами варіаційної статистики з використанням критерію Стьюдента-Фішера.

**Результати дослідження та їх обговорення**

Результати дослідження NO-залежних окислювальних процесів, що виникали в щурів під впливом субтоксичних доз Л-502-2-10, свідчили про їх активацію в порівнянні з групою контрольних тварин (Табл. 1). Ці зміни характеризувалися суттєвим підвищенням рівня в крові метгемоглобіну. Найбільш висока його концентрація спостерігалась у щурів, які були токсифіковані 1/10 ДЛ50. Так, рівні окисленого гемоглобіну підвищувалися в 7,37 і 3,9 рази, відповідно під впливом 1/10 й 1/100 ДЛ50. В 1/1000 ДЛ50 «Лапрол» не впливав на цей показник у порівнянні з групою контролю. Відомо, що в механізмах утворення NO приймає участь протеїногенна амінокислота L-аргінін. Продуктом її обміну є непротеїногенна амінокислота L-цитрулін. Дослідження в плазмі крові цих субстратів виявили підвищення вмісту L-цитруліну на 94,86% й 53,28%, а також зниження концентрації L-аргініну на 56,15% й 47,12%, відповідно під впливом 1/10 й 1/100 ДЛ50. Ці дані дають можливість судити про активацію ферментативного NO-синтазного окислення гуанідинової групи L-аргініну й утворення проміжного продукту L-гідроксиаргініну, а на наступному етапі – L-цитруліну й NO у вільнорадикальній формі [10]. Мішенню дії NO є ГЦ, яка призводить до утворення цГМФ, через який і здійснюється реалізація ефектів NO. Аналіз показав підвищення в печінці активності ГЦ на 145,31% й 99,21% та вмісту

Таблиця 1

**Результати оцінки впливу Л-502-2-10 на NO-окислювальні процеси в умовах тривалої субтоксичної дії**

|  |  |
| --- | --- |
|  Показники | Групи спостереження (M±m), ДЛ50 |
| Контроль( n=10) | 1/10(n=10) | 1/100(n=10) | 1/1000(n=10) |
| Метгемоглобіна | 1,32±0,16 | 9,73±0,84\* | 5,16±0,62\* | 1,43±0,18 |
| L-цитруліна | 14,6±1,12 | 28,45±1,57\* | 22,38±1,43\* | 15,67±1,14 |
| L-аргініна | 23,58±1,43 | 10,34±0,88\* | 12,47±1,15\* | 24,40±1,63 |
| цГМФ,нмоль/г | 114,6±7,54 | 209,3±10,6\* | 178,56±8,7\* | 119,6±6,84 |
| ГЦ, нмоль цГМФ /хв·мг білка | 1,28±0,03 | 3,14±0,26\* | 2,55±0,18\* | 1,30±0,04 |
| ФДЕ, нмоль/хв·мг білка | 1,22±0,15 | 2,96±0,23\* | 2,43±0,21\* | 1,27±0,13 |
| Поглинання 45Са2+, імп/хв·мг білка | 2945,6±60,4 | 5874,3±72,5\* | 5468,8±65,7\* | 2986,7±80,5 |
| NO2-а | 11,7±0,98 | 26,5±1,37\* | 19,6±1,22\* | 12,3±1,14 |
| NO3-а | 21,65±1,43 | 42,58±2,16\* | 33,24±1,85\* | 22,55±1,47 |
| S-нітрозотіола | 0,34±0,05 | 0,65±0,07\* | 0,53±0,06\* | 0,33±0,04 |
| еNOS,ммоль/хв·мг білка | 0,53±0,07 | 0,97±0,08\* | 0,84±0,07\* | 0,52±0,06 |
| iNOS,ммоль/хв·мг білка | 0,22±0,03 | 0,78±0,06\* | 0,63±0,05\* | 0,21±0,02 |

Примітка: \* – різниця вірогідна р < 0,05, а - мкмоль/л

цГМФ на 82,63% й 55,81%, відповідно під впливом «Лапрола» в 1/10 й 1/100 ДЛ50. Катаболізм NO здійснюється через утворення NO2- і NO3-, а цГМФ метаболізується відповідно ФДЕ до ГМФ.  Результати дослідження показали, що Л-502-2-10 підвищував у печінці активність ФДЕ на 147,62% й 99,18%, атакож вміст у сироватці крові NO2- – на 126,49% й 67,52%, NO3- – на 96,67% й 53,53%, відповідно під впливом ксенобіотика в 1/10 й 1/100 ДЛ50. Отримані дані вказують на значну продукцію NO, NO2- і NO3- у токсифікованих тварин. Це забезпечує можливість залучатися NO до реакцій з гемоглобіном або через взаємодію NO з супероксид-аніоном та утворенням пероксинітриту (ONOO-). NO, NO2-й NO3- мають високу спорідненість і можуть залучатися до реакції з гемовою групою гемоглобіну, як і з іншими гемовмісними білками й ферментами, утворюючи при цьому метгемоглобін. Цей механізм є найбільш імовірним в умовах токсифікації тварин Л-502-2-10 і накопичення при цьому метгемоглобіну, що свідчить про цитотоксичну дію ксенобіотика в 1/10 й 1/100 ДЛ50. Поряд з тим відомо, що NOвідіграє універсальну роль модулятора багатьох фізіологічних функцій серцево-судинної, центральної нервової, імунної, м’язової, дихальної, травної й інших систем організму [11]. NO відповідає за тонус судин, міжклітинну комунікацію, модуляцію нейротрансмісії, рівень імунотоксичності, секрецію гормонів, медіаторів [10, 11]. Ця молекула може бути пагубною як для клітин, включаючи ракові, так і для внутрішньоклітинних патогенних мікроорганізмів. Було встановлено, що цитотоксичність NO є результатом утворення великої кількості цих молекул, які ініціюють апоптоз [12, 13]. Подвійність дії NO проявляється в здатності захищати клітини від апоптозних сигналів і визивати апоптоз. Буде чи ні молекула NO володіти цитотоксичними властивостями, залежить від типу клітин, фази їх розвитку, біоелектричного потенціалу, локальної концентрації NO й інших активних форм кисню [11]. Вільний радикал NO в клітинах швидко взаємодіє з киснем, супероксидним аніон-радикалом кисню й металами гемових і негемових білків, внаслідок чого в клітині утворюються нітрозильні комплекси гемового й негемового заліза [10]. Безпосередньо з сульфгідрильними групами білків взаємодіє NO+,який утворюється з NO після відновлення з металами. Внаслідок цього в клітинах, при достатній кількості тіолів, під впливом NO здійснюється нітрозилювання й зміна активності металовмісних білків, які мають активні цистеїнові центри [11, 12]. При утворенні великої кількості NO, він під впливом NO-синтази може взаємодіяти з супероксидним аніоном, утворюючи другу активну форму кисню – ONOO-, яка здатна вступати в реакцію відновлення з глутатіоном і вуглекислим газом. У цьому випадку утворюється нітрозопероксикарбонат (ONO2CO2-), який легко визиває хімічну модифікацію реактивних залишків тирозину в білках, що супроводжується зміною їх активності. Окрім цього, токсичний ONOO- здатний неінзиматично продукувати гідроксильні токсичні радикали (OH-), включаючи таким чином молекулу NO в процес утворення активних форм кисню [10, 11], які володіють властивістю окислювати білки, ліпіди й нуклеїнові кислоти. Результати дослідження показали, що Л-502-2-10 після 60 добової токсифікації щурів підвищував вмістS-нітрозотіолу на 91,17% й 55,88%, а також активність NOS на 83,01% й 58,49% та іNOS на 254,54% й 186,36%. Ці дані вказують, що поліоксипропіленгліколь молекулярної маси 500 в 1/10 і 1/100 ДЛ50 активує оксидативні процеси, які супроводжуються накопиченням активних форм кисню, продуктів нітрозилювання, зміною функціональної активності клітин, що віддзеркалює розвиток цитотоксичних ефектів. Відомо, що iNOS, яка продукує NO для захисту організму, може призводити до розвитку цитотоксичних ефектів. Результати дослідження виявили значне підвищення активності цього ферменту під впливом як 1/10, так і 1/100ДЛ50 на тлі накопичення NO й інших активних форм кисню, що може виступати провідним фактором апоптозу. Активація апоптозу клітин підтверджувалася підвищенням поглинання 45Ca2+мікросомами гепатоцитів (див. табл.) на 99,42% й 85,65%, відповідно в тварин, токсифікованих 1/10 й 1/100 ДЛ50.

         **Висновки**

Таким чином, результати дослідження свідчать, що Л-502-2-10 в субтоксичних дозах (1/10 й 1/100 ДЛ50), за умов тривалої дії в підгострому експерименті на щурах, здатний накопичувати в організмі високі рівні NO, ONOO-, ONO2CO2- та інших активних кисневих радикалів, які спроможні окислювати білки, ліпіди, нуклеїнові кислоти, біологічні мембрани й ініціювати апоптоз клітин, що може виступати одним із провідних патохімічних механізмів формування структурно-метаболічних порушень. Недіючою дозою при тривалому впливі ксенобіотика на організм була 1/1000 ДЛ50.

**Література:**

1. Щербань Н.Г. Биохимические аспекты экологической патологии, связанной с химическим загрязнением поверхностных источников водоснабжения / Н.Г. Щербань, В.И. Жуков, В.В. Мясоедов [и др.] – Харьков: «Раритеты Украины», 2011. – 176 с.

2. 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.

3. Жуков В.И., Зайцева О.В., Пивень В.И. Фториды: биологическая роль и механизм действия / Жуков В.И., Зайцева О.В., Пивень В.И. – Белгород: «Белвитамины», 2006. – 220 с.

4. Жуков В.И. Детергенты – модуляторы радиомиметических эффектов / [Жуков В.И., Мясоедов В.В., Козин Ю.И. и др.] – Белгород: «Белвитамины», 2000. – 357 с.

5. Жуков В.И., Попова Л.Д., Зайцева О.В., Кратенко Р.И. и др. Простые и макроциклические эфиры: Научные основы охраны водных объектов / [Жуков В.И., Попова Л.Д., Зайцева О.В., Кратенко Р.И. и др.]  – Харьков: «Торнадо», 2000. – 438 с.

6. Кушаковский М.С. Клинические формы повреждения гемоглобина / Кушаковский М.С. – Ленинград: Медицина, 1968. – 33 с.

7. Чирков Ю.Ю. Гуанилатциклаза тромбоцитов крови человека / Ю.Ю. Чирков, И.А. Тищук, Н.Н. Белушкина, И.С. Северина // Биохимия. – 1987. – Т. 52, Вып. 6. – С. 956–963.

8. Kuo J.F., Shoji M., Brackett N.L., Helfman D.M. // J. Cycl. Nucl. Res. – 1978. – Vol. 4. – P. 463–474.

9. Кравцов Г.М. Транспорт кальция в синаптосомы и субклеточные фракции головного мозга: влияние опиоидных пептидов / Г.М. Кравцов, Г.Г. Райский, С.Н. Орлов // Биохимия. – 1982. – Т. 44, Вып. 12. – С. 2006–2014.

10. Жуков В.І. NO-залежні механізми токсичності синтетичних детергентів / В.І. Жуков, В.В. М’ясоєдов // Вісник проблем біології і медицини. – 2002. – Вип. 2. – С.12–22.

11. 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.

12. Зайцева О.В. Состояние активности NO-синтазы и содержание оксида азота у больных псориазом / О.В. Зайцева, В.И. Жуков, Е.А. Броше // Вісник проблем біології і медицини. – 2002. – № 1. – С. 80–85.

13. 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.