

© Кучерявченко М. А.

УДК [616-099:543. 39:612. 015. 11]- 036. 11-092. 9

Кучерявченко М. А.

ВЛИЯНИЕ ЛАПРОКСИДОВ НА СОСТОЯНИЕ ОКСИДАНТНО-Антиоксидантного взаимодействия под воздействием субтоксических доз в подостром опыте

Харьковский национальный медицинский университет

(г. Харьков)

Работа выполнена в рамках научно-исследовательской темы ХНМУ «Изучение механизмов биологического действия простых полиэфиров в связи с проблемой охраны окружающей среды», № государственной регистрации 0110U001812.

Вступление. Результаты исследований многих авторов свидетельствуют о невозможности формирования манифестных признаков экологически обусловленных болезней без нарушения структурно-функционального состояния биологических мембран. Известно, что важная роль в обеспечении их динамической стабильности принадлежит интегративным системам контроля гомеостатической функции организма: нервной, эндокринной, иммунной [3, 5, 12]. Эти системы обеспечивают относительное динамическое постоянство крови, лимфы, межклеточной жидкости и основных физиологических функций – кровообращения, дыхания, терморегуляции, обмена веществ и энергии организма. Регуляторные механизмы интегративных систем обеспечивают гомеостаз и поддерживают метаболическое состояние клеток, органов и целостного организма на оптимальном уровне, что обеспечивает надежность их функционирования, обновления и воспроизведения, в основе которых лежит принцип саморегуляции. Структурно-функциональная организация метаболических процессов поддерживается интегративными системами контроля гомеостаза и направлены они, прежде всего, на ограничение, предупреждение и нормализацию нарушений, которые возникают под влиянием различных внешних (физических, химических) и внутренних (метаболических) факторов. Это дает возможность организму поддерживать относительное динамическое постоянство, направленное на поддержание гомеостаза, который в широком смысле охватывает цикличность, многообразие течения биохимических реакций, процессы компенсации и регуляции метаболизма, динамику кооперативных взаимодействий нервной, эндокринной и иммунной систем, в том числе, механизмы защиты и восстановления организма.

Цель исследования – поиск критериально-значимых и адекватных показателей оценки состояния системно-антисистемного взаимодействия в донозологической диагностике преморбидных

изменений в организме в условиях антропогенного воздействия химических факторов.

Объект и методы исследования. Выбор объектов настоящего исследования в значительной мере обусловлен необходимостью получения прогноза потенциальной опасности новой группы веществ промышленности органического синтеза – «Лапроксидов» марки Л-303 и Л-500, соответственно триглицидилового эфира полиоксипропиленгликоля молекулярной массы 303 и этиленгликольпропиленэпоксида молекулярной массы 500. В работе были использованы вещества с регламентированными физико-химическими свойствами. На основании параметров острой токсичности лапроксиды относятся к малотоксичным, слабокумулятивным веществам, необладающим видовой и половой чувствительностью. Среднесмертельные дозы (ДЛ₅₀) на белых крысах были установлены на уровнях 5,75 и 26,7 г/кг массы животного, соответственно для Л-303 и Л-500 [12].

Программа исследований предусматривала проведение подострого опыта на половозрелых белых крысах популяции Вистар массой 190-200 г. В соответствии с условиями эксперимента животные подвергались ежедневной, на протяжении 45 суток, пероральной заправке лапроксидами, утром до кормления с помощью металлического зонда в дозах 1/10; 1/100; 1/1000 ДЛ₅₀. Контрольная группа животных получала соответствующие объемы питьевой воды. В каждой группе насчитывалось по 10 животных. Всего было использовано 70 животных при соблюдении биоэтики и принципов «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для научных и других целей» (Страсбург, 1985 г.).

Приоритетным являлось изучение влияния лапроксидов на состояние процессов оксидантно-антиоксидантного взаимодействия в условиях длительного субтоксического поступления в организм и выделение наиболее чувствительных и критериально-значимых показателей оценки гомеостатической функции организма. Для этого программа исследования предусматривала определение диеновых конъюгатов (ДК), малонового диальдегида (МДА) в соответствии с методическими рекомендациями [1, 6, 13], активности каталазы, пероксидазы, глутатионпероксидазы (ГПО) по методикам [4, 7, 8,

Влияние лапроксидов на состояние системы оксидантно-антиоксидантного взаимодействия в подостром эксперименте

Показатели	Группа наблюдения, ДЛ ₅₀ М±m						
	Контроль (n=10)	Л-303			Л-500		
		1/10 (n=10)	1/100 (n=10)	1/1000 (n=10)	1/10 (n=10)	1/100 (n=10)	1/1000 (n=10)
ДК (мкмоль/л), сыворотка крови	46,3±3,8	96,8±7,5*	78,6±5,7*	52,4±4,2	92,3±6,7*	69,7±5,4*	47,5±4,8
МДА (мкмоль/л), сыворотка крови	12,7±1,45	32,5±2,6*	21,5±1,8*	14,2±1,53	36,4±2,8*	23,7±1,82*	13,6±1,42
Каталаза (мкат/г Hb), цельная кровь	5,4±0,48	2,3±0,35*	12,4±1,2*	6,1±0,57	2,1±0,26*	11,8±0,95*	5,8±0,63
ЦП (мкмоль/л), сыворотка крови	2,8±0,33	8,3±0,72*	6,3±0,44*	3,1±0,35	7,8±0,84*	6,5±0,57*	3,4±0,38
Г-SH (ммоль/л), кровь	1,4±0,12	0,72±0,09*	3,1±0,26*	1,53±0,17	0,63±0,07*	3,3±0,22*	1,47±0,16
Пероксидаза крови (мкат/г Hb),	12,6±0,93	29,7±1,58*	18,9±1,53*	14,2±1,33	27,9±0,65*	21,3±1,46*	13,4±1,25
ГПО эритроцитов (мкат/г Hb)	6,7±0,44	3,2±0,37*	13,4±1,15*	6,2±0,58	3,4±0,43*	12,5±0,97*	5,9±0,63
СОД (мкат/мг Hb), кровь	0,57±0,06	2,4±0,22*	1,2±0,14*	0,52±0,08	2,15±0,18*	1,37±0,16*	0,54±0,07
SH-группы (моль/л), кровь	20,3±1,75	38,5±2,4*	12,3±1,26*	18,4±1,63	41,6±3,7*	9,75±1,13*	19,7±1,86
H ₂ O ₂ индуцированная люминолзависимая БХЛ (имп/сек), сыворотка	975,8±63,4	1836,3±145,8*	1548,7±110,4*	1056,4±85,7	1785,6±128,7*	1479,3±105,6*	1076,3±79,4
ФС сыворотки, λвозб. = 297 нм (имп/сек)	4143,6±72,3	6243,5±115,8*	5106,7±89,6*	4205,6±80,4	6200,4±125,8*	5127,3±97,8*	4103,7±69,5

Примечание: * – различия достоверные p ≤ 0,05.

14], супероксиддисмутазы (СОД) по методу описанному В. С. Гуревич, 1990 [2], определение церулоплазмينا (ЦП) осуществлялось по Равину [9, 10], восстановленного глутатиона (Г-SH), свободных сульфгидрильных групп (SH-группы) по методу описанному С. Е. Севериным и Т. А. Соловьевой [11].

Процентное содержание фракций фосфолипидов в эритроцитах и гепатоцитах проводилось методом двумерной хроматографии [12]. Для оценки свободнорадикальных процессов, перекисного окисления липидов (ПОЛ), окислительной модификации белков использовались также биофизические методы – биохемилюминесценция (БХЛ) и фосфоресценция (ФС). Согласно литературным данным, интенсивность БХЛ в системе индуцированной перекисью водорода, отражает образование наиболее реакционноспособных радикалов (ОН⁻ гидроксильного, O₂^{•-} супероксидного анион-радикала кислорода) с которыми взаимодействуют биологические субстраты – белки, липиды, нуклеиновые кислоты [1]. Они инициируют цепной свободнорадикальный процесс, ПОЛ, протекающие в мембранах клеток, а также в липопротеинах крови. По мнению многих авторов, накопление активных форм кислорода, перекисей, гидроперекисей, свободных радикалов потенцирует развитие мембранной патологии и усиливает скорость старения организма [1, 6, 12, 13].

Статическая обработка полученных результатов осуществлялась с использованием методов вариационной статистики по Стьюденту-Фишеру.

Результаты исследований и их обсуждение.

Изучение влияния лапроксидов на состояние процессов системно-антисистемного взаимодействия обнаружило, что ксенобиотики в 1/1000 ДЛ₅₀ не нарушали активность антиоксидантной системы. В пересчете на массу тела животных это равнялось 5,75 и 26,7 мг/кг, соответственно для Л-303 и Л-500.

Вещества в 1/100 ДЛ₅₀ повышали в сыворотке и цельной крови содержание ДК, МДА, Г-SH, активность ферментов – каталазы, пероксидазы, ГПО, СОД, ЦП на фоне усиления БХЛ, ФС и снижения свободных SH-групп (табл. 1). Эти данные свидетельствуют, что лапроксиды в 1/100 ДЛ₅₀ стимулируют свободнорадикальные процессы, ПОЛ и систему антирадикальной, антиперекисной защиты.

Вместе с тем, следует отметить, иную динамику исследуемых показателей у групп животных токсифицированных 1/10 ДЛ₅₀. Ксенобиотики в этой дозе продолжали повышать накопление в организме ДК, МДА и снижали активность каталазы, ГПО, Г-SH. ЦП, пероксидаза и СОД повышались еще более значительно по сравнению с дозой 1/100 ДЛ₅₀. Сходная динамика была присуща для БХЛ и ФС. Анализ результатов показывает, что вещества в 1/10 ДЛ₅₀ стимулируют свободнорадикальные процессы, ПОЛ на

Таблица 2

Влияние лапроксидов на процентное содержание фракций фосфолипидов в 1/10 ДЛ₅₀

Показатели	Группа наблюдения, М ± m					
	Эритроциты			Гепатоциты		
	Контроль	Л-303	Л-500	Контроль	Л-303	Л-500
ФЭА	22,53 ± 1,1	17,9 ± 1,2*	18,2 ± 0,98*	20,2 ± 1,02	16,7 ± 0,97*	15,8 ± 0,84*
СМ	16,3 ± 0,9	14,2 ± 0,80*	15,4 ± 0,74*	15,5 ± 1,1	12,4 ± 0,74*	12,5 ± 0,93*
ФС	11,83 ± 0,71	8,4 ± 0,66*	8,3 ± 0,68*	15,3 ± 1,2	12,2 ± 0,85*	11,4 ± 0,82*
ФИ	6,24 ± 0,05	3,7 ± 0,50*	3,6 ± 0,48*	7,26 ± 0,63	3,3 ± 0,46*	3,4 ± 0,37*
ФХ	40,1 ± 1,32	46,4 ± 2,48*	45,6 ± 2,20*	37,6 ± 1,2	47,3 ± 2,4*	48,2 ± 2,6*
ЛФЭА	1,12 ± 0,06	3,7 ± 0,43*	3,8 ± 0,47*	1,2 ± 0,07	3,6 ± 0,42*	3,4 ± 0,38*
ЛФХ	1,41 ± 0,05	3,6 ± 0,35*	3,7 ± 0,44*	1,13 ± 0,05	3,5 ± 0,32*	3,8 ± 0,46*
КЛ	0,52 ± 0,03	2,2 ± 0,28*	1,4 ± 0,18*	0,46 ± 0,05	0,88 ± 0,04*	1,5 ± 0,12*

Примечание: * различия достоверные p ≤ 0,05.

фоне ингибирования антиоксидантной системы.

Особого внимания заслуживает динамика SH-групп, количество которых в дозе 1/10 ДЛ₅₀ существенно повышалось. Такая динамика SH-групп может быть объяснена структурно-метаболической дезорганизацией клеточного аппарата и развитием мембранной патологии, что выступает критериально-значимым показателем развития свободнорадикальной мембранной патологии. Результаты динамики ДК, МДА, БХЛ и ФС убедительно

подтверждают данные о накоплении в организме токсифицированных животных активных форм кислорода, перекисей, гидроперекисей, свободных радикалов, которые способны ингибировать антиоксидантную систему и формировать развитие мембранной патологии. Повышение уровней интенсивности люминол-зависимой БХЛ индуцированной Н₂О₂, подтверждает цепной свободнорадикальный характер происходящих процессов в биологических системах, которые впоследствии активируют ПОЛ и окислительную модификацию белков, нуклеиновых кислот и др.

Исследования показывают, что в условиях подострой интоксикации лапроксидами образуется супероксидный анион-радикал кислорода и гидроксильный радикал, которые сопряжены с наличием высоких уровней возбужденных электронных состояний. Система высоких энергетических уровней триплетного состояния электронов в белках подтверждалась нами при изучении ФС сыворотки крови опытных и контрольных животных, а многими авторами методом электронного парамагнитного резонанса [12].

Наличие высоких уровней триплетных возбужденных молекул, обусловленных неспаренными электронами, может свидетельствовать об изменении конформации белковых молекул, присутствующих в сыворотке крови и связанных с окислительной их модификацией под влиянием исследуемых лапроксидов (табл. 1). Это нашло подтверждение в значительном накоплении МДА, ДК и подавлении системы антирадикальной и антиперекисной защиты.

Учитывая, что исследуемые соединения содержат гидрофильные группы и гидрофобные радикалы, обеспечивающие поверхностно-активные свойства молекуле, можно предположить вероятность их влияния на белковые и липидные компоненты клеточных мембран. Результаты исследования обнаружили, что лапроксиды способны нарушать процентное содержание фракций фосфолипидов мембран эритроцитов и гепатоцитов (табл. 2). Так, в дозе 1/10 ДЛ₅₀ ксенобиотики снижали содержание фосфатидилэтаноламина (ФЭА), сфингомиелина (СМ), фосфатидилинозитола (ФИ), фосфатидилсерина (ФС), на фоне повышения процентного содержания фосфатидилхолина (ФХ), лизофосфатидилхолина (ЛФХ), лизофосфатидилэтаноламина (ЛФЭА) и кардиолипина (КЛ), что подтверждало мембраноповреждающее действие лапроксидов.

Вывод. Результаты исследований свидетельствуют, что лапроксиды Л-303 и Л-500 в дозе 1/100 ДЛ₅₀ стимулируют свободнорадикальные процессы, перекисное окисление липидов и антиоксидантную систему. В 1/10 ДЛ₅₀ на фоне активации свободнорадикальных процессов и ПОЛ, лапроксиды ингибируют систему антирадикальной и антиперекисной защиты формируя развитие мембранной патологии. Критериально-значимым показателем диагностики мембранной патологии может быть высокий уровень в крови свободных сульфгидрильных групп.

Перспективы дальнейших исследований. В перспективе планируется исследование влияния лапроксидов на нейромедиаторные процессы в головном мозге, на различные виды обмена (белковый, углеводный, минеральный, липидный, нуклеиновый).

Литература

1. Гаврилов Б. В. Сф-метрическое определение содержания ГПЛ в плазме крови / Б. В. Гаврилов, М. И. Мишкорудная // Лаб. дело. – 1983. – № 3. – С. 33 – 36.
2. Гуревич В. С. Сравнительный анализ двух методов определения активности СОД / В. С. Гуревич, К. Н. Конторщиков, Л. В. Шатилина // Лаб. дело. – 1990. – № 4. – С. 44 – 47.
3. Действие оксиэтилированного ксилита марки Л-655 на рецепторный аппарат и систему медиаторной регуляции внутриклеточного метаболизма / О. В. Зайцева, В. И. Жуков, Н. А. Ващук [и др.] // Экспериментальна і клінічна медицина. – 2006. – № 3. – С. 66 – 69.

4. Дубинина Е. Е. Методы определения активности каталазы / Е. Е. Дубинина, Л. Ф. Ефимова, Л. Н. Сафронова // Лаб. дело. – 1988. – № 8. – С. 16 – 19.
5. Изучение влияния простых полиэфиров П-373-2-20, П-5003АЦ и П-294-2-35 на реализацию нейромедиаторных эффектов в условиях токсикологического опыта / В. И. Жуков, В. А. Телегин, Зайцева О. В. [и др.] // Медицина сьогодні і завтра. – 2008. – № 1. – С. 37 – 42.
6. Косухин А. Б. Экстракция липидов смесью гептан-изопропанол для определения диеновых конъюгатов / А. Б. Косухин, Б. С. Ахметова // Лаб. дело. – 1987. – № 5. – С. 335 – 337.
7. Лошинский А. В. Определение активности ферментов фибринолитической системы с использованием фибриногена конъюгированного с пероксидазой / А. В. Лошинский, Г. А. Афанасенко, Е. В. Гудкова // Лаб. дело. – 1991. – № 11. – С. 27 – 31.
8. Меин В. М. Простой и специфический метод определения активности ГПО в эритроцитах / В. М. Меин // Лаб. дело. – 1986. – № 12. – С. 724 – 727.
9. Мошков К. А. Определение ферментативной активности и иммунореактивности церулоплазмينا в сыворотке крови человека / К. А. Мошков // Лаб. дело. – 1985. – № 7. – С. 390 – 395.
10. Подильчак М. Д. Клиническая энзимология / Подильчак М. Д. – К.: Здоров'я, 1967. – 292 с.
11. Практикум по биохимии / Под ред. С. Е. Северина, Т. А. Соловьевой. – М.: Изд-во МГУ, 1989. – С. 160 – 161.
12. Простые и макроциклические эфиры: научные основы охраны водных объектов / [Жуков В. И., Попова Л. Д., Зайцева О. В. и др.]. – Харьков, «Торнадо», 2000. – 435 с.
13. Федорова Т. К. Реакция с ТБК для определения МДА крови методом флюорометрии / Т. К. Федорова, Т. С. Коршунова, Э. Т. Ларская // Лаб. дело. – 1983. – № 3. – С. 25 – 28.
14. Чевари С. Определение антиоксидантных параметров крови и их значение в пожилом возрасте / С. Чевари, Т. Андел, Я. Штрэнгер // Лаб. дело. – 1991. – № 10. – С. 9 – 13.

УДК [616-099:543.39:612.015.11]-036.11-092.9

ВПЛИВ ЛАПРОКСИДІВ НА СТАН ОКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЇ ВЗАЄМОДІЇ ПІД ДІЄЮ СУБТОКСИЧНИХ ДОЗ У ПІД ГОСТРОМУ ДОСЛІДІ

Кучерявченко М. О.

Резюме. Вивчено вплив лапроксидів Л-303 і Л-500 у дозах 1/10; 1/100; 1/1000 ДЛ₅₀ на стан процесів оксидантно-антиоксидантної взаємодії в умовах тривалого субтоксичного надходження в організм білих щурів та виділення критеріально-значущих показників оцінки гомеостатичної функції організму. Було встановлено, що ксенобіотики у дозі 1/1000 ДЛ₅₀ не порушують активність антиоксидантної системи; у дозі 1/100 ДЛ₅₀ стимулюють вільно радикальні процеси, перекисне окислення ліпідів і антиоксидантну систему; а в дозі 1/10 ДЛ₅₀ на тлі активації вільно радикальних процесів і перекисного окислення ліпідів, лапроксиди пригнічують систему антирадикального та антиперекисного захисту, формуючи розвиток мембранної патології. Критеріально-значущим показником діагностики мембранної патології може бути високий рівень у крові вільних сульфгідрильних груп.

Ключові слова: лапроксиди, ксенобіотики, мембранна патологія.

УДК [616-099:543.39:612.015.11]-036.11-092.9

ВЛИЯНИЕ ЛАПРОКСИДОВ НА СОСТОЯНИЕ ОКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ СУБТОКСИЧЕСКИХ ДОЗ В ПОДОСТРОМ ОПЫТЕ

Кучерявченко М. А.

Резюме. Изучено влияние лапроксидов Л-303 и Л-500 в дозах 1/10; 1/100; 1/1000 ДЛ₅₀ на состояние процессов оксидантно-антиоксидантного взаимодействия в условиях длительного субтоксического поступления в организм белых крыс и выделение критеріально-значимых показателей оценки гомеостатической функции организма. Было установлено, что ксенобіотики в дозе 1/1000 ДЛ₅₀ не нарушают активность антиоксидантної системи; в дозе 1/100 ДЛ₅₀ стимулируют свободнорадикальные процессы, перекисное окисление липидов и антиоксидантную систему; а в дозе 1/10 ДЛ₅₀ на фоне активации свободнорадикальных процессов и перекисного окисления липидов, лапроксиды ингибируют систему антирадикальной и антиперекисной защиты формируя развитие мембранной патологии. Критеріально-значимым показателем диагностики мембранной патологии может быть высокий уровень в крови свободных сульфгидрильных групп.

Ключевые слова: лапроксиды, ксенобіотики, мембранная патология.

UDC [616-099:543.39:612.015.11]-036.11-092.9

Laproxide Effect on Oxidative-Antioxidative Relationship under the Action of Subtoxic Doses in Subacute Assay

Kucheriavchenko M. A.

Abstract. The aim of the investigation was searching for criterion-significant and adequate assessment indices of system-antisystem interaction in prenosological diagnostics of premorbid changes in the body in the presence of human-induced disturbances of chemical factors. The research involved the study of effect of a new group of organic chemical industry substances such as "Laproxides" L-303 and L-500, triglycidyl ester of polyoxypropylene triol with molecular mass of 303 and ethylene glycol propyleneepoxide with molecular mass of 500, relatively.

The research program involved subacute experiment on mature rats with the weight of 190-200 g. For 45 days animals were exposed to daily oral inoculation of laproxides (L-303) and (L-500) in doses of 1/10; 1/100; 1/1000 LD₅₀.

The research program covered such aspects as identification of diethenoid conjugate, malondialdehyde, activity test of catalase, peroxydase, glutathione peroxydase, superoxide dismutase, ceruleoplasmin, reduced glutathione and free sulfhydryl groups. The percentage of phospholipid fractions in erythrocytes and hepatocytes was identified. Biochemoluminescence and phosphorescence were also used to evaluate free-radical processes, lipid peroxxygenation and protein oxidative modification.

Investigations demonstrate the formation of oxygen superoxide anion radical and hydroxyl radical which are associated with high levels of excited electronic states in the presence of subacute laproxide intoxication. High levels of triplet activated molecules due to unpaired electrons may indicate the change in the conformation of protein molecules which are present in blood serum and connected with their oxidative modification influenced by laproxides under investigation. It was confirmed by sizable accumulation of malondialdehyde, diethenoid conjugate and suppression of anti-radical and anti-peroxide defense.

The results of research showed that laproxides are able to destroy the percentage of phospholipid fractions of erythrocytes and hepatocytes membranes. Thus, xenobiotics in the dose of 1/10 LD₅₀ reduced the amount of phosphatidylethanolamine, sphingomyelin, phosphatidylinositol and phosphatidylserine associated with the increase of percentage of phosphatidylcholine, lysophosphatidylcholine, lysophosphatidylethanolamine and cardiolipin which confirmed membrane-damaging action of laproxides.

It has been shown that xenobiotics in the dosage of 1/1000 DL50 do not interfere with antioxidative system activity; in the dosage of 1/100 DL50 they have been found to stimulate free-radical processes, lipids peroxidation and antioxidative system; and in the dosage of 1/10 DL50 against the background of free-radical processes activation and lipids peroxidation laproxides have been found to inhibit the system of anti-radical and anti-peroxidation protection by the development of membrane impairment. A high level of free sulfhydryl groups in blood can be a relevant criterion index in diagnostics of membrane defects.

Key words: laproxides, xenobiotics, membrane impairment.

Рецензент – проф. Жуков В. І.
Стаття надійшла 12. 05. 2014 р.