

В.І. Жуков,
А.Б. Мітряєв,
Р.І. Кратенко

Харківський державний
медичний університет

Дія йонізуючого випромінювання та 12-краун-4 на активність антиоксидантної системи й інтенсивність перекисного окиснення ліпідів

The effect of ionizing radiation and 12-crown-4 on antioxidant system activity and lipid peroxidation intensity

Цель работы: Сравнение действия 12-краун-4 и ионизирующего излучения на активность антиоксидантной системы и скорость перекисного окисления липидов (ПОЛ) в условиях подострого эксперимента на белых крысах.

Материалы и методы: Первой опытной группе животных в течение 15 дней ежедневно с помощью зонда вводили водную эмульсию 12-краун-4 в 1/1000 ДЛ₅₀ (1,79 мг/кг). Вторая опытная группа крыс ежедневно круглосуточно (в течение того же срока) получала хроническое общее облучение, генерируемое с помощью установки «Эксперимент» (Россия, источник γ -излучения ⁶⁰Co). Для изучения состояния антиоксидантной системы определяли количество свободных SH-групп в крови методом апотетричного титрования, содержание SH-глутатиона и активность церулоплазмينا в сыворотке крови; активности ферментов каталазы, пероксидазы крови и содержание витамина С в надпочечниках. Состояние свободнорадикальных процессов окисления оценивалось по содержанию диеновых конъюгатов и малонового диальдегида (МДА) в печени.

Результаты: Эксперименты выявили однонаправленное достоверное повышение интенсивности биоchemiluminesценции органов и тканей у крыс обеих экспериментальных групп. Обнаружено снижение активности церулоплазмينا и SH-глутатиона в сыворотке крови, уменьшение содержания SH-групп и активности ферментов каталазы, пероксидазы в крови животных обеих групп. Содержание витамина С в надпочечниках имело тенденцию к повышению на 7-й день эксперимента, но достоверно ($p < 0,05$) снижалось в обеих экспериментальных группах крыс к концу опыта (облученные животные – $7,38 \pm 0,257$; животные, затравленные 12-краун-4 – $8,17 \pm 0,340$; контроль – $11,41 \pm 0,420$ мкм/г ткани). Влияние ионизирующего излучения и 12-краун-4 также приводило к значительному накоплению диеновых конъюгатов и малонового диальдегида (продуктов ПОЛ) в крови опытных животных.

Выводы: В основе повреждающего действия краун-эфиров и радиационного излучения лежит свободнорадикальная патология, сопровождающаяся нарушением биоэнергетики, окислительно-восстановительных процессов и изменением структурной организации клеточных биомембран. По механизму биологического действия 12-краун-4 как характерный представитель макроциклических краун-эфиров может относиться к радиомиметикам.

Ключевые слова: ионизирующее излучение, краун-эфиры, антиоксидантная система, биоchemiluminesценция, витамин С, перекисное окисление липидов.

Objective: To compare 12-crown-4 and ionizing radiation action on antioxidant system activity and lipid peroxidation rate at subacute experiment conditions with white rats.

Material and methods: The animals from the first experimental group were administered 12-crown-4 water emulsion at 1/1000 LD₅₀ (1.79 mg/kg). The rats from the second experimental group were exposed to chronic general irradiation (24 hours a day, daily, within the same period) generated with «Experiment» unit (Russia, γ -radiation source – ⁶⁰Co). The antioxidant system was studied by determination of free blood SH-group amount with apometric titration method, SH-glutathione contents and ceruloplasmin activity in the blood serum, blood catalase and peroxidase enzyme activity, and vitamin C contents in adrenal glands. Free radical oxidation process state was evaluated by liver dienic conjugate and malonic dialdehyde contents (MDA).

Results: Experiments demonstrated unidirectional reliable increase in organ and tissue biochemiluminescence of both experimental groups. Ceruloplasmin and SH-glutathione activity of the blood serum and catalase and peroxidase activity of the blood decreased in both groups. Vitamin C contents of the adrenal gland elevated on the 7th experimental day, but it significantly ($p < 0,05$) decreased towards the end of the experiment in both groups of rats (exposed animals – 7.38 ± 0.257 , 12-crown-4 toxified animals – 8.17 ± 0.340 , controls – 11.41 ± 0.420 micromol/g). The influence of ionizing radiation and 12-crown-4 also resulted in significant dienic conjugate and malonic dialdehyde (lipid peroxidation products) accumulation in the liver of the experimental animals.

Conclusions: Crown-ether and radiation damage effects are based on free radical pathology accompanied by bioenergetic and redox process disturbance and cellular membrane structural organization alterations. According to its biological action, 12-crown-4 as a characteristic representative of macrocyclic crown-ethers may be related to radiomimetics.

Key words: ionizing radiation, crown-ethers, antioxidant system, biochemiluminescence, vitamin C, lipid peroxidation.

Нині проблема охорони навколишнього середовища набуває все більшого значення. Численні хемічні токсичні речовини, чужорідні для організму людини, надходять у біосферу

й впливають на здоров'я населення. Токсична дія багатьох коенціотиків добре вивчена, втім підприємства органічного виробництва хемічної промисловості постійно синтезують

нові сполуки. Останніми роками в дослідженнях механізму біологічної дії деяких низькомолекулярних речовин і продуктів їх трансформації була встановлена їх здатність імітувати радіобіологічні ефекти. Серед речовин із радіоміметичними властивостями привертають увагу такі сполуки, як формальдегід, масляний, оцтовий, пропіоновий, гліцериновий, кротоновий альдегіди, малоновий діальдегід (МДА), ацетон, спирт та ін. [1]. Слід зважати, однак, що більшість ксенобіотиків у процесі деструкції в організмі можуть перетворюватися в зазначені вище сполуки. Це повністю стосується речовин численної групи краун-ефірів. Вони становлять макрогетероциклічні системи з 9–60 атомами в циклі, з яких третину складають атоми ефірного кисню, розділені між собою етановими групами [2]. Найважливішою властивістю макроциклічних поліефірів є їхня здатність утворювати стійкі комплекси із солями лужних та інших металів, приєднуючи катіон [3]. Властивість краун-ефірів «коронувати» катіон та їх корноподібна молекулярна структура були прийняті С. Дж. Pedersen за основу принаймні у назві цього класу сполук («crown» – корона) [4]. Унікальна здатність краун-ефірів утворювати комплекси з катіонами металів, що мають високу електропровідність, розчинятися в багатьох неводних розчинниках (ліпофільність), включати в макроцикліхральні атоми зумовлює широке використання цих речовин при виробленні прикладних завдань у металургії, електрохімії, каталізі, тонкому органічному синтезі, фармацевтичному аналізі [5].

Раніше ми показали, що в процесах гідролітичної й термічної деструкції в воді та біологічної трансформації в організмі гетероциклічні кільця краун-ефірів розпадаються, утворюючи широкий спектр біологічно активних низькомолекулярних сполук [6]. З огляду на ліпофільність, комплексоутворювальні та йонофорні властивості макроциклічних ефірів, а також відому мембранотропність продуктів, ідентичних тим, що виникають при деструкції й біотрансформації краун-ефірів, можна очікувати на радіоміметичний ефект у досліджуваних групах сполук.

Отже, метою нашої роботи було порівняння дії краун-ефірів (12-краун-4) та йонізуювального випромінювання на активність антиоксидантної системи й швидкість переокисного окиснення ліпідів (ПОЛ) в умовах підгострого експерименту, виконаного згідно з методичними вказівками до проведення й наукового обґрунтування гранично допустимих концентрацій шкідливих речовин [7].

Методика дослідження

Експеримент проводили на білих щурах масою 180–210 г, яких утримували в стандартних умовах віварію. Першій дослідній групі тварин протягом 15 днів щодня за допомогою зонда вводили водну емульсію 12-краун-4 у 1/1000 ДЛ₅₀ (1,79 мг/кг). Друга дослідна група щурів щодня цілодобово (протягом того ж терміну) одержувала хронічне загальне опромінення, генероване установкою «Експеримент» (Росія, джерело γ -випромінювання ⁶⁰Co). Дозиметричний контроль проводили клінічним дозиметром типу 27012 з дозиметричною камерою Va-K-254 (Veb RFT Messelektronik «Otto Schon», Німеччина). Довірчі похибки визначали безпосередньо в кожній клітці, куди на час опромінювання розміщували щурів. Експозиційна доза у прямому пучку складала $5,5 \pm 0,3$ МГр/год; у зоні опромінення, прилеглій до прямого пучка, $-0,05 \pm 0,3$ МГр/год; сумарна поглинена доза – $1,8-1,9$ Гр.

Після завершення експерименту тварин декапітували гільйотинним ножом із попередньою анестезією натрію тіопенталом (50 мг/кг внутріочеревинно) [8] і проводили дослідження сироватки крові. Для вивчення стану антиоксидантної системи визначали кількість вільних SH-груп у крові методом апотричного титрування [9], вміст SH-глутатіону [10] й активність церулоплазміну в сироватці крові [11]; активності ферментів каталази [12], пероксидази в крові [13] і вміст вітаміну С в надниркових залозах за класичним методом [14].

Стан вільнорадикальних процесів окиснення оцінювали за вмістом дієнових кон'югат і МДА в печінці за допомогою уніфікованих біохімічних методів дослідження [15]. Інтенсивність біохімілюмінесценції (БХЛ) як інтегральний показник вільнорадикального окиснення (ВРО) гомогенатів органів і тканин вимірювали відповідно до методичних рекомендацій Ю.А. Владімірова [16] на вітчизняному медичному біохімілюмінометрі БХЛМЦ1-01.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою пакета програм «Statgraphic» із використанням ПК.

Результати та їх обговорення

Результати експериментів виявили односпрямоване вірогідне підвищення інтенсивності БХЛ органів і тканин у щурів обох експериментальних груп (табл. 1).

Стан антиоксидантної системи щурів також істотно змінювався під дією йонізуювального випромінювання і 12-краун-4 (табл. 2). Виявлено зниження активності церулоплазміну в си-

Таблиця 1 – Інтенсивність БХЛ (імп/сек) органів і тканин щурів при дії йонізуючого випромінювання і 12-краун-4
Biochemiluminescence intensity (pulse/s) in the organs and tissue of rats at exposure to ionizing radiation and 12-crown-4

Експериментальна група	Кількість тварин	Печінка	Надниркові залози	Сироватка крові
Контроль	7	820,4±30,5	402,0±21,2	282,2±22,3
Опромінені тварини	7	1725,3±50,6*	1150,5±40,5*	690,3±18,5*
12-краун-4	7	1878,2±28,3*	1080,2±17,3*	640,5±12,7*

Примітка: * – розбіжності вірогідні, порівняно з контролем $p < 0,05$.

Таблиця 2 – Стан антиоксидантної системи щурів при дії йонізуючого випромінювання і 12-краун-4
The state of antioxidant system in rats at exposure ionizing radiation and 12-crown-4

Експериментальна група	Кількість тварин	SH-групи, мкМ/100 мл	SH-альдегід, мкМ	Церулоплазмін, од.екс.	Каталаза, кат. число	Пероксиду газу, ум. од.
Контроль	7	80,5±3,9	464,6±35,8	82,3±4,6	7,4±0,3	74,0±0,6
Опромінені тварини	7	60,3±2,5*	312,5±24,3*	60,4±2,16*	5,8±0,12*	46,1±2,6*
12-краун-4	7	73,2±1,8*	324,2±27,5*	55,1±1,7*	4,8±0,6*	33,0±2,5*

Примітка. * – розбіжності вірогідні, порівняно з контролем $p < 0,05$.

роватці крові і зменшення вмісту SH-груп, SH-глютатіону й активності ферментів каталази, пероксидази в крові тварин обох груп.

Вміст вітаміну С в надниркових залозах мав тенденцію до підвищення на 7-й день експерименту, але вірогідно ($p < 0,05$) знижувався в обох експериментальних групах щурів до кінця дослідження (опромінені тварини – 7,38±0,257; тварини, інтоксиковані 12-краун-4 – 8,17±0,340; контроль – 11,41±0,420 мкМ/г тканини).

Вплив йонізуючого випромінювання й 12-краун-4 призводило до значного накопичення дієнових кон'югат і МДА (продуктів перекисного окиснення ліпідів) у печінці досліджених тварин (табл. 3).

Таблиця 3 – Вплив йонізуючого випромінювання і 12-краун-4 на накопичення МДА і дієнових кон'югат у печінці щурів

Influence of ionizing radiation and 12-crown-4 on accumulation of malonic dialdehyde and dienic conjugates in the liver of the rats

Експериментальна група	Кількість тварин	Дієнові кон'югати, нМ/мг тканини	МДА, нМ/мг тканини
Контроль	7	2,65±1,4	0,95±0,07
Опромінені тварини	7	4,73±0,45*	4,17±0,33*
12-краун-4	7	5,68±0,23*	5,30±0,25*

Примітка: * – розбіжності вірогідні, порівняно з контролем $p < 0,05$.

Хемілюмінесценція біосубстратів і біологічних рідин характеризує, в першу чергу, інтенсивність ВРО тканинних ліпідів і є основним із тестів у комплексній діагностиці вільнорадикальної патології [16].

Вільнорадикальна патологія – відщиплення на молекулярному рівні, патогенетичним фактором якого є підвищена інтенсивність ПОЛ і накопичування його токсичних кінцевих продуктів. Вона визначається принаймні трьома

групами критеріїв:

а) накопичення ліпідних перекисів, дієнових кон'югат, МДА, підсиленням БХЛ;

б) зниженням рівня тканинних антиоксидантів (гемоглобін, глутатіон, вітамін С, SH-групи, адреналін, токоферол та ін.);

в) паралельним зростанням тяжкості клінічних симптомів і поліпшенням стану в результаті застосування профілактичних засобів – біоантиоксидантів [15].

Підвищення БХЛ у дослідних групах свідчить, що як йонізуюче опромінювання, так і токсична дія 12-краун-4 стимулюють вільнорадикальне ПОЛ і знижують антиоксидантну активність органів і тканин.

Підтвердженням тому була зміна динаміки вмісту SH-груп, глутатіону, пероксидази, каталази в органах і тканинах обох груп експериментальних тварин за результатами піддоного дослідження. Ці результати свідчать про порушення стану антиоксидантної системи й активування вільнорадикального ПОЛ. Аналіз демонструє вищу чутливість БХЛ порівняно з іншими тестами.

Зменшення кількості сульфогідрильних груп і глутатіону свідчить про знижену здатність організму тварин нейтралізувати вільні радикали.

За сучасними даними, кора надниркових залоз становить депо вітаміну С в організмі. Підвищення кількості вітаміну С в надниркових залозах у першу половину експериментального терміну під впливом іонізуючої радіації й 12-краун-4 пов'язане з підсиленням його синтезу (організм пацюків має здатність синтезувати вітамін С) і трактується як захисно-компенсаторна реакція, оскільки цей вітамін бере участь у синтезі гормонів надниркових залоз, окисно-відновних реакціях, гемопоезі, посттрансляційній модифікації білка, головне, є найсильнішим водорозчинним антиоксидантом, що охороняє білки цитоплазматичних мембран від дії вільних радикалів. У разі тривалого впливу ксенобіотиків на організм, біосинтез вітаміну С не може забезпечити підвищену потребу, тому зниження вмісту цього вітаміну в надниркових залозах вважається найнадійнішим показником їх функціонального виснаження.

Зниження активності каталази й пероксидази, ферментів, які нейтралізують перекиси під дією досліджуваних факторів, очевидно, пов'язане з інгібуванням їх синтезу, оскільки під впливом краун-ефірів і радіаційного випромінювання спостерігається гальмування синтезу білка [17].

Між швидкістю перекисного окиснення, накопиченням його продуктів і вмістом антиоксидантів існує зворотна залежність: збільшення кількості антиоксидантів, що реагують із вільними радикалами, знижує швидкість перекисного окиснення; його прискорення, що призводить до збільшення кількості радикалів, знижує концентрацію антиоксидантів. У наших експериментах 12-краун-4 та йонізуювальне випромінювання виснажували антиоксидантну систему щурів. У результаті цього активізувалося ПОЛ (накопичувалися МДА і дієнові кон'югати). Активізація перекисного окиснення вносить подальший дисбаланс в окисно-відновні процеси й таким чином утворює замкнене коло. Це може призводити до розладу регулювання всіх ферментних систем, зміни конформації мембранного ліпопротеїнового комплексу, появи гідрофільних включень у суцільному гідрофобному шарі мембрани [15].

Висновки

1. В основі дії краун-ефірів та ушкоджувального радіаційного випромінювання лежить вільнорадикальна патологія біосенергетики, що супроводжується порушенням окисно-відновних процесів і зміною структурної організації клітинних біомембран.

2. За механізмом біологічної дії 12-краун-4 є характерним представником макроциклічних краун-ефірів і може належати до радіоміметиків.

Література

1. Кузин А. М. Структурно-метаболическая теория в радиобиологии. – М.: Наука, 1986. – 256 с.
2. Максютин Н. П., Ветютнева П. А., Назаренко А. Ю., Митченко Ф. А. // Фармацевтич. журн. – 1991. – № 3. – С. 67–74.
3. Яцимирский К. Б., Ламнека Я. Д. Физикохимия комплексов металлов с макроциклическими лигандами. – К.: Наукова думка, 1985. – 256 с.
4. Pedersen C. J. // Journal of American Chemical Society. – 1967. – Vol. 89, № 10. – P. 2495–2496.
5. Хираока М. Краун-соединения, свойства и применение. – М.: Мир, 1986. – 277 с.
6. Кратенко Р. И. Анализ продуктов гидролитической и термической деструкции макроциклических эфиров / Гигиена населенных мест. – К., 2001. – Т. 3, В. 38. – С. 211–216.
7. Методические указания по разработке и научному обоснованию ПДК вредных веществ. – М., 1975. – № 1296–75.
8. С. М. Ланг, Р. П. Уилсон // Лабораторные животные. – 1993. – Т. 3, № 2. – С. 100–101.
9. Бахшиев Ю. А. // Гигиена применения пестицидов и клиника отравлений. – К., 1971. – Вып. 9. – С. 261–264.
10. Архипова А. Г., Шилцкая Н. Н., Семенова Л. С. // Методы исследования в профпатологии. – М.: Медицина, 1988. – С. 15–17.
11. Bergmeyer H. U., Bernt E. Methoden der enzymatischen analys. – Berlin, 1970. – Bd. 3. – S. 1536–1543.
12. Подильчак М. Д. Клиническая энзимология. – К.: Здоров'я. – 1967. – 286 с.
13. Асатиани В. С. Ферментные методы анализа. – М.: Наука, 1969. – 560 с.
14. Birch F. W., Harries L. J., Raw S. W. // Biochem. J. – 1933. – Vol. 27, № 2. – P. 590–594.
15. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. – М.: Наука, 1972. – 320 с.
16. Владимиров Ю. А., Оленов В. И., Гаврилов В. Б. // Свободнорадикальное окисление липидов в норме и патологии. – М.: Наука, 1976. – С. 30–31.
17. Кратенко Р. И. Биологическая активность краун-эфиров в связи с проблемой охраны водных объектов. – Харьков: ХГМУ, 2001. – 207 с.

Дата надходження: 29.03.2002.

Дата остаточного надходження: 05.04.2002.

Адреса для листування:

Кратенко Роман Іванович,
ХДМУ, кафедра біохімії, пр-т Леніна, 4, Харків,
61022, Україна