

УДК 577.121.7: 577.164.15: [616.831+616.155.1] – 092.9 – 099: 547.412

ВПЛИВ НИКОТИНАМІДУ НА ПЕРЕБІГ РЕАКЦІЙ ПЕРОКСИДНОГО ОКИСЛЕННЯ БІОМОЛЕКУЛ У ГОЛОВНОМУ МОЗКУ ТА ЕРИТРОЦИТАХ ЩУРІВ ЗА ТОКСИЧНОГО УРАЖЕННЯ 1,2-ДИХЛОРЕТАНОМ

Л. В. ЯНІЦЬКА¹, Ю. І. ГУБСЬКИЙ¹, Т. М. КУЧМЕРОВСЬКА², М. М. ВЕЛИКИЙ¹

¹Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, Київ, Україна;

²Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: kuch@biochem.kiev.ua

Установлено, що острое отравление крыс 1,2-дихлорэтаном приводит к существенным изменениям показателей пероксидного окисления липидов и белков, содержания глутатиона и активности антиоксидантных ферментов – супероксидазы, каталазы, глутатионпероксидазы – в ткани головного мозга, эритроцитах и плазме крови. Показано, что введение животным никотинамида (200 мг/кг массы тела) в значительной степени препятствует вызванной ксенобиотиком интоксикации организма, активации липопероксидации и угнетению активности ферментов антиоксидантной защиты.

К л ю ч е в ы е с л о в а: пероксидное окисление липидов, ферменты антиоксидантной защиты, кислотный гемолиз эритроцитов, 1,2-дихлорэтан, никотинамид.

Реакції пероксидного окислення біомолекул відіграють, згідно з сучасними уявленнями, провідну роль у розвитку процесів хімічного uszkodження клітин за інтоксикації організму ксенобіотиками. Так, при його ураженні хлорованими алканами, зокрема тетрахлорметаном, розвивається оксидативний стрес, за якого генерація активних форм кисню (АФК) переважає їхню елімінацію ферментними та неферментними системами антиоксидантного захисту (АОЗ) клітин [1]. Вважають, що основним біохімічним механізмом активації вільнорадикальних процесів під час uszkodження організму хлоралканами є реакції окисного дегалогенування чужорідної молекули за участю цитохром Р-450-залежної монооксигеназної системи ендоплазматичного ретикулума печінки з утворенням вільнорадикальних продуктів та АФК, які стимулюють реакції пероксидної модифікації біомолекул – ліпідів, білків та нуклеїнових кислот [2].

Подібно до тетрахлорметану, цитотоксичний хлоралкан 1,2-дихлоретан (1,2-ДХЕ) також знає у тканинах окисного дехлорування мікросомними оксигеназами змішаної функції з утворенням високореактивних інтермедіатів (вільних радикалів, АФК та епоксидів). Останні здатні взаємодіяти з макромолекулами, ініціюючи розвиток патологічних процесів, що призводить до загибелі клітин шляхом некрозу або апоптозу [3]. На відміну від інших хлорованих алканів, зокрема тетрахлорметану, 1,2-ДХЕ має виражену нейротоксичну дію, яка клінічно виявляється в роз-

витку гострої або хронічної енцефалопатії, порушенні свідомості, мозочкових та екстрапірамідальних розладах, глибоких психічних та вегетативних порушеннях. Раніше нами було встановлено, що після отруєння щурів 1,2-ДХЕ спостерігається uszkodження нервових закінчень мембран головного мозку. Воно супроводжується пригніченням активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази, зниженням швидкості енергозалежного зворотного поглинання $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ серотоніну синаптосомами та зменшенням вмісту поліненасичених жирних кислот в їхніх мембранах [4]. Усі вищезазначені біохімічні порушення значною мірою нормалізуються після введення отруєним тваринам нікотинаміду.

Дослідження процесів пероксидного окислення мембранних ліпідів та стану системи антиоксидантного захисту в головному мозку щурів після інтоксикації їх 1,2-ДХЕ (можливого механізму первинного uszkodження ліпідного матриксу субклітинних мембран і білків нервових клітин, та відповідно, нейротоксичних ефектів цього хлоралкану) раніше не проводилися. Саме це було метою нашої роботи.

З огляду на інтенсивне утворення АФК в еритроцитах, важливо було дослідити в них, а також у плазмі крові і головному мозку щурів активність пероксидного окислення ліпідів та білків. Можливий коригувальний вплив нікотинаміду оцінювали за інтенсивністю процесів пероксидної модифікації тканинних ліпідів у тварин після інтоксикації їх 1,2-ДХЕ.

Матеріали і методи

У досліджах використовували шурів-самців лінії Вістар з масою тіла 150–180 г. Тваринам одноразово внутрішньочеревно вводили 25%-й олійний розчин 1,2-ДХЕ (3,0 мл/кг маси тіла). Дослідження проводили через 48 год після ін'єкції їм ксенобіотика. Тварин поділили на 3 групи: 1 – контрольна (шурам вводили олію), 2 – шурів отруювали 1,2-ДХЕ, 3 – інтоксикованим 1,2-ДХЕ тваринам внутрішньочеревно вводили нікотинамід (200 мг/кг маси тіла) через 1, 24 та 36 год після дії ксенобіотика.

Вміст ТБК-активних продуктів визначали в гомогенаті тканин головного мозку, гемолізатах еритроцитів та у плазмі крові за реакцією з тіобарбітуровою кислотою [5], кількість дієнових кон'югатів – за інтенсивністю поглинання світла гептановою фракцією [6].

Активність супероксиддисмутази (СОД) оцінювали за здатністю ферменту конкурувати з нітросинім тетразолієм за супероксидні аніон-радикали, що утворюються внаслідок взаємодії NADH та феназинметасульфату. В разі присутності в реакційному середовищі СОД відновлення нітросинього тетразолію блокується [7].

Активність каталази і глутатіонпероксидази визначали за швидкістю розщеплення пероксиду водню [8] та окислення відновленого глутатіону з використанням реактиву Еллмана і за наявності в реакційному середовищі гідропероксиду третинного бутілу [9].

Ступінь окислювальної модифікації білків крові та тканини мозку визначали за вмістом карбонільних похідних білків (кетон-2,4-динітрофенілгідразонів), індукованих дією АФК за присутності донорів електронів та металів змінної валентності, зокрема іонів заліза чи міді [10]. Еритроцити розділяли у градієнті щільності сахарози [11].

Про функціональний стан плазматичної мембрани еритроцитів судили за їхньою стійкістю до дії кислотного гемолітика, а неспецифічну проникність еритроцитів (еритроцитарний індекс інтоксикації) – за накопиченням у клітинах барвника метиленового синього [12].

Результати та обговорення

Вільнорадикальні процеси, що супроводжуються утворенням АФК і пероксидним окисленням біомолекул, постійно відбуваються у тканинах, забезпечуючи їхнє оновлення та регуляцію клітинної активності. В нормі АФК і радикальні сполуки, які беруть участь у метаболізмі структурних компонентів біологічних мембран (ліпідів, білків) та нуклеїнових кислот, відіграють роль вторинних месенджерів, регулюючи ріст, дифе-

ренціацію, адгезію і апоптоз клітин. Інтенсивність вільнорадикальних процесів обумовлюється, перш за все, особливостями метаболізму певних тканин та їхнім функціональним навантаженням. Дані, наведені в таблиці 1, свідчать, що вміст продуктів пероксидної модифікації як ліпідів (дієнових кон'югатів, ТБК-активних продуктів), так і білків в еритроцитах контрольних шурів істотно перевищує такий у тканині мозку і, особливо, у плазмі крові.

За нормального функціонування організму у тканинах підтримується динамічна рівновага між про- та антиоксидантною системами. Стабільний рівень АФК забезпечується системою АОЗ, що включає, крім ферментів, неферментні метаболіти антиоксидантної дії, провідне місце серед яких належить відновленому глутатіону [13]. Висока активність системи АОЗ притаманна тканинам з інтенсивним перебігом вільнорадикальних процесів. Відповідно до цього активність СОД, каталази і глутатіонпероксидази (ГПО) та вміст відновленого глутатіону є високими саме в еритроцитах (табл. 2). На відміну від них тканинам мозку властива низька активність практично всіх компонентів ферментативної ланки АОЗ та достатньо високий рівень відновленого глутатіону ($5,24 \pm 0,42$ нмоль/мг білка).

Порушення метаболічної рівноваги в бік збільшення генерації активних форм кисню і зменшення потужності АОЗ за дії токсичних чинників, зокрема інтоксикації організму 1,2-ДХЕ, призводять до розвитку оксидативного стресу, що виявляється у значній стимуляції процесів пероксидації біомолекул та інгібуванням активності ферментів АОЗ (табл. 1 та 2). Свідченням активації пероксидного окислення ліпідів у тканинах за гострого отруєння шурів 1,2-ДХЕ є значне підвищення вмісту проміжних та кінцевих продуктів пероксидного окислення ліпідів. Зокрема, вміст дієнових кон'югатів у тканині мозку, еритроцитах та плазмі крові зростає у 3,2; 4,9 і 2,2 раза відповідно. Збільшення в цих зразках рівня кінцевих молекулярних продуктів ліпопероксидації – ТБК-позитивних сполук – було менш вираженим і становило відповідно 85, 245 та 86%. Водночас в них істотно (на 36, 61, та 25%) зменшувався вміст відновленого глутатіону. Відомо, що 1,2-ДХЕ і його метаболіти у другій фазі детоксикації організму вступають в реакцію кон'югації із глутатіоном, що може спричинити швидке виснаження його запасів у тканинах.

Як свідчать дані табл. 1, за гострої інтоксикації тварин 1,2-ДХЕ посилюється окислювальна модифікація тканинних білків. Так, вірогідне зростання порівняно з контролем вмісту нейтральних та основних 2,4-динітрофенілгідразонів,

що віддзеркалює утворення карбонільних груп у поліпептидних ланцюгах, спостерігається в моз-

ку (на 42,1 і 50,8%), еритроцитах (на 101 та 80,2%) і плазмі крові (на 41,4 і 38,5%).

Таблиця 1. Вміст продуктів пероксидного окислення ліпідів і окислювальної модифікації білків за дії на щурів 1,2-ДХЕ та на тлі введення в організм нікотинамід (M ± m, n = 6–8)

Умови досліджу	нмоль на 1 мг білка			2,4-диніпрофенілгідрозони, мкмоль/мг білка	
	Дієнові коньюгати	ТБК-позитивні продукти	GSH	Нейтральні (λ 370 нм)	Основні (λ 430 нм)
<i>Тканина мозку</i>					
Контрольні щури	4,97 ± 0,39	7,31 ± 0,51	5,24 ± 0,42	0,38 ± 0,02	0,57 ± 0,04
Введення шурам:					
1,2-ДХЕ	15,91 ± 0,95*	13,52 ± 0,67*	3,36 ± 0,20*	0,54 ± 0,04*	0,86 ± 0,07*
1,2-ДХЕ + нікотинамід	6,75 ± 0,60**	8,24 ± 0,57**	5,10 ± 0,41**	0,44 ± 0,03	0,63 ± 0,04**
<i>Еритроцити</i>					
Контрольні щури	14,27 ± 0,71	8,39 ± 0,58	4,73 ± 0,23	0,55 ± 0,04	0,71 ± 0,05
Введення шурам:					
1,2-ДХЕ	70,12 ± 7,20*	28,94 ± 2,60	1,86 ± 0,14	1,11 ± 0,07*	1,28 ± 0,11*
1,2-ДХЕ + нікотинамід	25,63 ± 2,30**	13,17 ± 1,05**	3,05 ± 0,27**	0,67 ± 0,04**	0,83 ± 0,05**
<i>Плазма крові</i>					
Контрольні щури	1,28 ± 0,03	0,81 ± 0,06	0,36 ± 0,02	0,22 ± 0,01	0,39 ± 0,03
Введення шурам:					
1,2-ДХЕ	2,85 ± 0,18*	1,51 ± 0,03*	0,27 ± 0,01*	0,31 ± 0,02*	0,54 ± 0,03*
1,2-ДХЕ + нікотинамід	1,43 ± 0,11**	0,94 ± 0,04**	0,30 ± 0,02	0,26 ± 0,03	0,43 ± 0,03

Тут і в табл. 2, 3: * зміни вірогідні порівняно з контролем, $p < 0,05$; ** зміни вірогідні, порівняно із тваринами, яким вводили лише 1,2-ДХЕ ($p < 0,05$). GSH – глутатіон відновлений.

Таблиця 2. Активність ферментів системи АОЗ за дії на щурів 1,2-ДХЕ та на тлі введення їм нікотинамід (M ± m, n = 6–8)

Умови досліджу	Супероксиддисмугаза, МО/хв на 1 мг білка	Каталаза, мкмоль H ₂ O ₂ / хв на 1 мг білка	Глутатіонпероксидаза, моль GSH/хв на 1 мг білка
<i>Тканина мозку</i>			
Контрольні щури	0,76 ± 0,05	1,24 ± 0,08	297,3 ± 22,7
Введення шурам:			
1,2-ДХЕ	0,31 ± 0,02*	0,53 ± 0,04*	165,7 ± 11,8*
1,2-ДХЕ + нікотинамід	0,68 ± 0,04**	1,06 ± 0,07**	259,8 ± 19,3**
<i>Еритроцити</i>			
Контрольні щури	3,42 ± 0,16	2,97 ± 0,24	675,4 ± 42,1
Введення шурам:			
1,2-ДХЕ	1,87 ± 0,12*	5,53 ± 0,45*	435,2 ± 30,4*
1,2-ДХЕ + нікотинамід	3,15 ± 0,17*	4,62 ± 0,36	640,3 ± 39,8**
<i>Плазма крові</i>			
Контрольні щури	1,26 ± 0,08	0,85 ± 0,05	32,5 ± 2,86
Введення шурам:			
1,2-ДХЕ	0,69 ± 0,03*	1,27 ± 0,09*	36,7 ± 3,05
1,2-ДХЕ + нікотинамід	0,95 ± 0,04*	1,01 ± 0,07**	31,1 ± 2,44

Під час окислювальної модифікації білків під впливом супероксидного, гідроксильного та органічних радикалів атакуються, переважно, аміногрупи, які містяться поряд з α -вуглецевим атомом поліпептидного ланцюга. OH^{\bullet} -залежне відщеплення атома водню від α -вуглецю та подальша взаємодія R-C^{\bullet} -радикала з киснем і супероксидним аніон-радикалом спричинює утворення алкілпероксидних та алкоксильних радикалів. З утворенням останніх пов'язують можливість розщеплення пептидного зв'язку та подальшу протеолітичну фрагментацію білкових молекул [14], що має визначальне значення в апоптичній загибелі клітин. Асоціація металів змінної валентності з молекулами білків індукуює каталізовану металом окислювальну модифікацію в тій частині поліпептиду, яка бере участь у його зв'язуванні [15]. За таким механізмом здійснюється окислювальна модифікація низки ферментів, зокрема каталази, СОД, ацетилхолінестерази тощо, що містять в активному центрі іони металів змінної валентності, [16]. З огляду на це, виявлена в наших дослідженнях істотна стимуляція окислювальної (пероксидної) модифікації білків головного мозку, еритроцитів та плазми крові щурів, інтоксикованих 1,2-ДХЕ, може бути одним із важливих біохімічних механізмів ураження клітин за дії цитотоксичних хлорорганічних сполук.

Введення отруєним 1,2-ДХЕ тваринам нікотинаміду – попередника в біосинтезі нікотинамідних коферментів – значною мірою нівелює зміни вмісту продуктів пероксидної модифікації ліпідів та білків, спричинених дією ксенобіотика (табл. 1). Так, у тканині головного мозку інтоксикованих тварин, яким вводили нікотинамід, кількість дієнових кон'югатів і ТБК-активних продуктів зменшується на 58 та 39% відповідно, в еритроцитах на 63 та 54%, у плазмі крові на 50 і 38%. Вірогідно знижується також інтенсивність окислювальної модифікації білків. З іншого боку, введення щурам нікотинаміду протидіє зменшенню вмісту GSH у тканинах тварин, отруєних хлоралканом: рівень його в головному мозку і в еритроцитах значно більший (на 52 та 64% відповідно), ніж у щурів, які не отримували коферментний попередник.

Підвищення вмісту проміжних та кінцевих продуктів пероксидації біомолекул у тканинах тварин за дії 1,2-ДХЕ є безпосереднім свідченням генерації АФК під час розвитку оксидативного стресу і порушень ферментативної та неферментативної ланок у системі АОЗ, зменшуючи її стійкість та буферну ємність. У механізмі регуляції вільнорадикальних та пероксидних процесів ключову роль відіграють ферменти-антиоксиданти, які взаємодоповнюють один

одного – СОД, каталаза та ГПО. Найпотужнішим природним антиоксидантом і ферментом першої ланки АОЗ є СОД, яка здійснює реакцію дисмутації супероксидних аніон-радикалів та перетворює їх на менш реакційноздатні молекули – H_2O_2 . Тому відмінності в активності цього ферменту характеризують глибину тканинного ураження та порушення метаболізму, зумовлених оксидативним стресом. Одержані нами дані активності СОД свідчать (табл. 2), що посилення вільнорадикальних процесів супроводжується вірогідним зниженням активності ферменту у тканині мозку, еритроцитах та у плазмі крові (на 59,2; 45,3 і 42,5% відповідно). Введення інтоксикованим щурам нікотинаміду нормалізує спричинене 1,2-ДХЕ зменшення активності СОД в головному мозку і еритроцитах щурів до показників у контролі.

Зміни в активності ферменту, ймовірно, зумовлюються модифікувальним впливом АФК, рівень яких значно зростає під час інтоксикації тварин. Наявність в активному центрі Cu, Zn-SOD металів змінної валентності, зв'язаних з імідазольними групами залишків гістидину, робить фермент особливо чутливим до дії високих концентрацій як АФК (супероксид-аніон-радикалу, гідроксильних радикалів, пероксиду водню), так і низки інтермедіатів ліпопероксидації, зокрема ендогенних гідропероксидів ненасичених жирних кислот, альдегідів, кетонів тощо [17]. Крім того, можна припустити, що за таких умов Cu, Zn-SOD може взаємодіяти з H_2O_2 і функціонувати як прооксидант, ініціюючи утворення гідроксильних супероксидних аніон-радикалів.

Важливою ланкою ферментативного АОЗ є каталаза та глутатіонпероксидаза, які елімінують відповідно H_2O_2 та гідропероксида ліпідів. Каталаза, що розщеплює пероксид водню, належить до гемовмісних ферментів і локалізована, переважно, в пероксисомах. Водночас вона може бути джерелом утворення активних метаболітів кисню, оскільки близько 0,5% O_2 після розщеплення H_2O_2 перебуває у збудженому синглетному стані. Максимальну активність каталази виявлено в еритроцитах, печінці та нирках. Висока концентрація її спостерігається також у тканині мозку, в той час як у щитовидній залозі та гонадах вона досить низька. Активність каталази за інтоксикації тварин 1,2-ДХЕ знижується у тканині мозку (на 57,1%) і зростає в еритроцитах (на 86%) та у плазмі крові (на 48,6%). Введення щурам нікотинаміду протидіє зазначеним змінам в активності ферменту як у головному мозку, так і у плазмі крові отруєних тварин (табл. 2).

Істотне підвищення активності каталази в еритроцитах після короткотривалої інтоксикації

1,2-ДХЕ можна розглядати як компенсаторну реакцію, спрямовану на нормалізацію процесів пероксидного окислення ліпідів. Токсичне ураження тканини мозку супроводжується пригніченням активності ферменту, ймовірно внаслідок деструкції плазматичних мембран та мембран пероксисом, в яких він, переважно, локалізується. При цьому відбувається вихід каталази у плазму крові. Крім того, причиною зниження її активності може бути зменшення синтезу ферменту через деградацію мембран гранулярного ендоплазматичного ретикулула.

У клітинах функціонує потужна глутатионова антиоксидантна система, яка включає низку ферментів – глутатіонпероксидазу, глутатіонредуктазу, глутатіон-S-трансферазу, глюкозо-6-фосфатдегідрогеназу та кофактори (глутатіон і NADPH). Захисні функції її під час оксидативного стресу визначаються специфічним парціальним внеском кожного індивідуального компонента. Зокрема, відновлений глутатіон формує клітинний фонд мобільних сульфгідрильних груп, забезпечує відновлення та ізомеризацію дисульфідних зв'язків у білках, бере участь в обміні ейкозаноїдів, метаболізмі ксенобіотиків, репаративних процесах та адаптації організму до дії несприятливих факторів. Селенозалежна глутатіонпероксидаза каталізує відновлення пероксиду водню та гідропероксидів органічних сполук (лінолевої, ліноленової і арахідонової кислот, холестеролу, кортикостероїдних гормонів та нуклеотидів ДНК) до їхніх гідроксипохідних за участю GSH. Дослідження глутатионової системи в разі ураження щурів 1,2-ДХЕ свідчать про зниження вмісту GSH у тканинах, яке, вірогідно, пов'язане з посиленням його використання у відновних процесах, спрямованих на підтримання високого ступеня відновленості білків та металів у металопротейнах, а також зниженням активності ферментів його синтезу (табл. 1).

Активність ГПО – ферменту, що взаємодіє з GSH, зменшується за інтоксикації організму 1,2-ДХЕ як у тканині мозку, так і в еритроцитах (на 44,3 та 35,6% відповідно). Основним чинником у пригніченні його активності за таких умов, очевидно, є окисна модифікація білка. У тканинах під впливом ксенобіотика швидкість відновлення гідропероксидів за участю ГПО також може обмежуватись зниженням концентрації субстрату – GSH, що і спостерігалось у наших експериментах. Патоморфологічні зміни в печінці внаслідок гострої інтоксикації тварин ксенобіотиком характеризуються вираженими некродистрофічними ознаками, набряком та гіпоксією, а у тканині мозку – гострою токсикогіпоксичною енцефалопатією, що призводить до значних пору-

шень у перебігу окисно-відновних процесів [18]. За тканинної гіпоксії гальмується транспортування електронів у дихальному ланцюгу, спостерігається роз'єднання дихання і фосфорилування, підвищення вмісту відновних еквівалентів нікотинамідних динуклеотидів – NADH та NADPH. Зниження окисно-відновного стану вільних NADP-пар (співвідношення $NADP^+/NADPH$) за цих умов може лімітувати глутатіон- та аскорбатзалежні окисно-відновні процеси. Відповідно до цього, додаткове введення щурам, отруєним 1,2-ДХЕ, попередника біосинтезу нікотинамідних коферментів – нікотинаміду – істотно інтенсифікує активність ГПО в головному мозку та еритроцитах (на 57 та 47% відповідно).

Слід зазначити, що досліджувані нами ферменти – СОД, каталаза та ГПО – не лише формують цілісну ферментативну систему АОЗ клітин, але й безпосередньо захищають одна одну від інактивації активними формами кисню. Зокрема, СОД, елімінуючи супероксидні аніон-радикали, усуває їхню дію на активний центр каталази. Водночас ГПО і каталаза, розщеплюючи H_2O_2 , захищають СОД від окисної модифікації. Тому лише спільна дія ферментів-антиоксидантів у клітині за дії оксидативного стресу або патології забезпечує не лише максимальний вияв їхньої біологічної активності, але й захист від АФК. І, навпаки, порушення такої кооперативності після зниження активності хоча б одного з ферментів-антиоксидантів під час окисної модифікації спричинює зміни у функціонуванні всієї системи АОЗ [19].

Сукупність фізико-хімічних властивостей мембран еритроцитів обумовлює їхню стійкість до дії несприятливих факторів. Лізис еритроцитів у кислотному середовищі відбувається за трьома стадіями: проникнення іонів водню крізь плазматичну мембрану, протонування гемоглобіну та осмотичне руйнування еритроцитів. Кінетика їхньої гемолітичної трансформації включає стадії набухання, сферуляції (набування сферичного стану) та лізису [20]. Тому показники стійкості еритроцитів широко використовуються в експериментальній медицині з метою характеристики їхнього функціонального стану. Активація пероксидного окислення ліпідів та окисна модифікація білків, які відбуваються за інтоксикації щурів 1,2-ДХЕ, призводять до руйнування біомембран і посилення кислотного гемолізу еритроцитів.

Нами проведені дослідження оцінки стійкості різновікових популяцій еритроцитів до дії кислотного гемолітика та загальної неспецифічної проникності еритроцитарної мембрани. Показано (табл. 3), що за дії на організм 1,2-ДХЕ істотно

Таблиця 3. Параметри кислотних еритрограм еритроцитів щурів за дії 1,2-дихлоретану та введення їм нікотинаміду ($M \pm m$, $n = 8-10$)

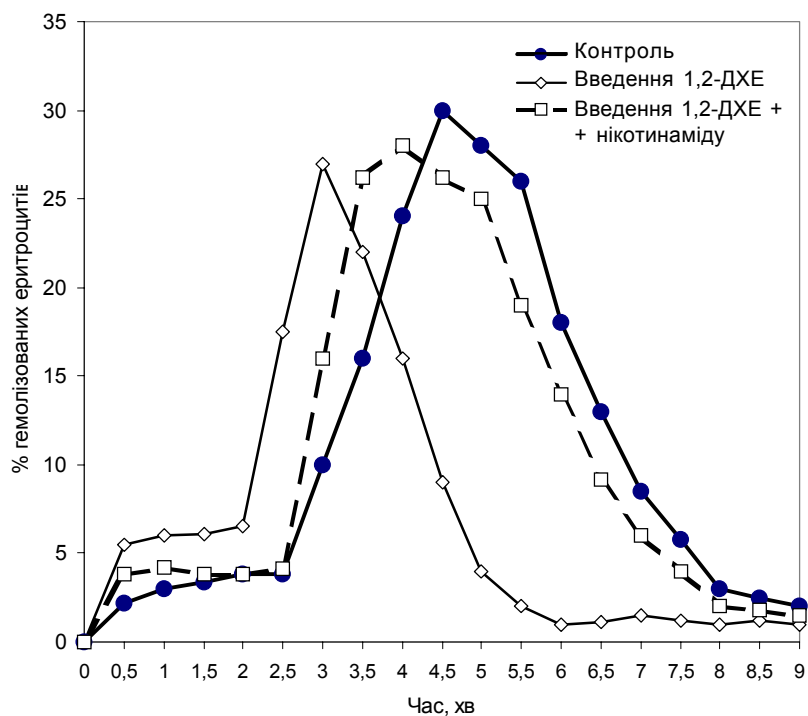
Показники	Контрольні щури	Введення шурам:	
		1,2-ДХЕ	1,2-ДХЕ + нікотинамід
<i>Нефракціоновані еритроцити</i>			
Максимальний час гемолізу, хв	4,5 ± 0,3	3,0 ± 0,2*	4,1 ± 0,2**
Тривалість сферуляції, хв	2,5 ± 0,2	1,9 ± 0,1*	2,3 ± 0,2
Проникність еритроцитарної мембрани, %	61,8 ± 4,2	79,3 ± 5,7*	69,6 ± 4,8
<i>Фракціоновані еритроцити</i>			
Низькостійкі, %	12,9 ± 0,7	25,3 ± 1,3*	16,5 ± 1,1**
Середньостійкі, %	52,5 ± 3,4	58,7 ± 4,1	53,7 ± 3,9
Підвищеної стійкості, %	26,4 ± 1,8	11,5 ± 0,6*	22,9 ± 1,7**
Високостійкі, %	8,2 ± 0,3	4,5 ± 0,2*	6,8 ± 0,4**

зростає швидкість лізису клітин, а тривалість максимуму гемолізу нефракціонованих еритроцитів периферичної крові щурів зменшується на 33,4% (з $4,5 \pm 0,3$ хв у контролі до $3,0 \pm 0,2$ хв в експерименті). Одночасно скорочується на 0,5 хв тривалість сферуляції (набування клітинами сферичного стану) – передгемолізної зміни форми еритроцитів.

Аналіз типових кислотних еритрограм нефракціонованих еритроцитів (рисунок) свідчить про чітко виражене зміщення кривих вліво, що обумовлено поєднанням дії двох чинників: скороченням тривалості сферуляції та часу досяг-

нення максимуму гемолізу. Нефракціоновані еритроцити периферичної крові є сукупністю клітин різного ступеня зрілості і функціональної активності, час перебування яких у крові неоднаковий. Відповідно, окремі популяції еритроцитів істотно відрізняються між собою за стійкістю до дії кислотного гемолітика, що, ймовірно, пов'язано як із віковими особливостями, так і дією сполук, які ініціюють пероксидне окислення ліпідів та окисну модифікацію білків еритроцитарної мембрани.

Шляхом фракціонування еритроцитів контрольних щурів у градієнті густини сахарози нами



Еритрограми нефракціонованих еритроцитів за введення шурам 1,2-ДХЕ та введення їм нікотинаміду.

одержано чотири основні фракції: 12,9% становили низькостійкі (умовна назва – “старі”), 52,5% – середньостійкі (“зрілі”), 26,4% – підвищеної стійкості та 8,2% – високостійкі (“молоді”) еритроцити. Отруєння тварин 1,2-ДХЕ зумовлює значний перерозподіл фракційного складу популяцій клітин: майже вдвічі зростає кількість низькостійких еритроцитів за рахунок значного зменшення (на 56,4%) фракцій підвищеної стійкості та високостійких (на 44,1%). Зростання популяції низькостійких, “старих” еритроцитів, а відтак і посилення гемолізу, очевидно, спричинено деструктивними змінами еритроцитарної мембрани під дією 1,2-ДХЕ, зокрема посиленням пероксидного окислення ліпідів, окисної модифікації білків та значним пригніченням за оксидативного стресу активності NADPH-метгемоглобінредуктази.

Ушкодження еритроцитарної мембрани внаслідок інтоксикації шурів 1,2-ДХЕ підтверджується збільшенням її загальної і неспецифічної проникності. Як впливає з даних табл. 3, ендогенна інтоксикація організму 1,2-ДХЕ, сприяє зростанню (на 34%) неспецифічної проникності еритроцитів.

Таким чином, проведені нами експерименти свідчать про значну активацію під час гострої інтоксикації шурів нейротоксичним ксенобіотиком 1,2-ДХЕ процесів пероксидного окислення ліпідів та білків не тільки у тканині мозку, а й в еритроцитах, що можна розглядати як ключовий патобіохімічний механізм біоцидної дії хлоралкану. Вперше виявлене в наших дослідженнях істотне посилення окислювальної модифікації білків 1,2-ДХЕ може бути надійним показником ушкодження тканин за дії токсичних факторів, оскільки утворені при цьому продукти є стабільними сполуками, що утримуються у тканинах і крові триваліший час, ніж продукти пероксидного окислення ліпідів. Особливо це стосується тканини мозку, яка через високий рівень метаболізму, унікальний ліпідний склад та низьку швидкість клітинного відновлення, є особливо чутливою до дії АФК. З окисною деструкцією білків у тканині мозку пов’язані порушення функціонування рецепторного апарату нейронів, іонних каналів та насосів, зокрема зниження активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази, глутамінсинтетази, тобто ферментів, які забезпечують підтримання іонних градієнтів та зменшення концентрації збудливих медіаторів [21]. В еритроцитах окислювальна модифікація білків спричинює порушення структурно-функціональної організації еритроцитарної мембрани, внаслідок чого знижується їхня стійкість до дії кислотного гемолітика та підвищується неспецифічна проникність, що, вірогід-

но, є одним із провідних механізмів розвитку гіпоксичних змін у тканинах за отруєння організму хлоралканами.

Проведеними дослідженнями підтверджено високий цитопротекторний ефект коферментного вітаміну – нікотинаміду – за дії на організм високотоксичних промислових отрут. З’ясовано, що нікотинамід, як попередник у біосинтезі нікотинамідних динуклеотидів (NAD(P)H), залучається до регуляції низки клітинних функцій. Так, зокрема, через підвищення внутрішньоклітинного пулу NAD^+ та стабілізацію величини співвідношення концентрацій вільних NAD^+/NADH - і $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ -пар забезпечується узгоджене функціонування у клітинах дегідрогеназних, оксигеназних, оксидазних та пероксидазних ферментних систем [22]. ADP-рибоза, що утворюється з NAD^+ , використовується як субстрат реакцій полі-ADP-рибозилування ядерних білків за участю полі-ADP-рибозополімерази, яка є тригером у системі ферментативної репарації одноланцюгових розривів ДНК, спричинених дією цитотоксичних та генотоксичних агентів [23]. Крім того, NAD^+ необхідний для синтезу cADP-рибози – вторинного посередника, що регулює вивільнення Ca^{2+} з ендоплазматичного ретикулума [24], яке порушується за отруєння організму високотоксичними хлоралканами [3]. Можна припустити, що зазначена сукупність коферментних та регуляторних властивостей нікотинамідних динуклеотидів може бути біохімічною основою їхньої захисної дії за токсичного ураження клітин.

INFLUENCE OF NICOTINAMIDE ON THE COURSE OF PEROXIDE OXIDATION REACTIONS OF BIOMOLECULES IN THE RAT BRAIN AND ERYTHROCYTES UNDER 1,2-DICHLOROETHANE TOXIC INJURY

L. V. Yanitska¹, Yu. I. Gubsky¹,
T. M. Kuchmerovska², M. M. Veliky¹

¹Bogomolets National Medical University, Kyiv;

²Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
e-mail: kuch@biochem.kiev.ua

S u m m a r y

It was established that acute poisoning of rats by 1,2-dichloroethane induced considerable changes in lipid peroxidation indices, glutathione content and activity of antioxidant enzymes – superoxidase, catalase, glutathione peroxidase in the brain tissue, erythrocytes and blood plasma. It was shown that nicotinamide in the dose of 200 mg/kg prevented

considerable degree of the intoxication caused by 1,2-dichloroethane as well as activation of lipid peroxidation and inhibition of antioxidant defense enzyme activities in tissue of experimental animals.

Key words: lipid peroxidation, antioxidant defense enzymes, acid hemolysis of erythrocytes, 1,2-dichloroethane, nicotinamide.

1. Губський Ю. И. Коррекция химического поражения печени. К.: Здоровья. 1989. 168 с.
2. Губський Ю. І. // Мед. хімія. 1999. 1. С. 7–14.
3. Губський Ю. И. // Лікування та діагностика. 2001. № 4. С. 8–13.
4. Губський Ю. І., Яніцька Л. В., Великий М. М., Кучмеровська Т. М. // Укр. біохім. журн. 2004. 76, № 6. С. 106–110.
5. Тимурбулатов М. А., Селезнева Е. И. // Лаб. дело. 1981. № 4. С. 209–211.
6. Гаврилов В. Б., Мишкорудная М. И. // Там же. 1983. № 3. С. 33–35.
7. Чевари С., Андял Т., Штрэнгер Я. // Там же. 1991. № 10. С. 9–13.
8. Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г., Токарев В. Е. // Там же. 1988. № 1. С. 16–19.
9. Моин В. И. // Там же. 1986. № 12. С. 724–727.
10. Арчаков А. И., Михосоев И. М. // Биохимия. 1998. 54, № 2. С. 179–186.
11. Сибірна Н. О., Великий М. М. Метод. посібник Львів: Львів. нац. ун-т. 1997. 70 с.
12. Фира Л. С. // Біол. тварин. 2003. 5, № 1–2. С. 316–319.
13. Шаповал Г. С., Громова В. Ф. // Укр. біохім. журн. 2003. 75, № 2. С. 5–13.
14. Davies K. J. A. // Biochem. Soc. Transaction. 1993. 21. P. 346–353.
15. Stadtman E. R. // Free Radic. Biol. Med. 1990. 9, N 9. P. 315–325.
16. Дубініна О. Ю. // Мед. хімія. 2001. 3, № 2. С. 5–12.
17. Дубинина Е. Е. // Успехи соврем. биол. 1989. 108. № 1(4). С. 3–18.
18. Бережной Р. В. Судебно-медицинская экспертиза отравлений техническими жидкостями. М.: Медицина. 1977. 208 с.
19. Michiels C., Raes M., Toussaint O., Remacle J. // Free Radical Biol. and Medicine. 1994. 17, N 3. P. 235–248.
20. Гроховський Т. В., Дацюк Л. О. // Експерим. та клін. фізіол. і біохімія. 2003. 1, № 21. С. 98–100.
21. Дубініна О. Ю. // Мед. хімія. 2002. 4, № 4. С. 5–12.
22. Veliky M. M., Vovk O. I., Aphonyushkin T. A. et al. // Experim. Oncol. 2001. 23, N 1. P. 39–42.
23. D'Amours D., Desnoyers S., D'Silva I., Poirier G. // Biochem. J. 1999. 342, N 2. P. 249–268.
24. Okamoto H., Takasawa S., Tohgo A. // Biochimie. 1995. 77, N 5. P. 356–363.

Отримано 05.03.2005