

УДК: 546.172.6:612.015.11:547.395:616-099-036.11-092.9

© Жуков В.И., Маракушин Д.И., Наконечна О.А., Вишницкая И.А., 2013

ВЛИЯНИЕ ДЕТЕРГЕНТОВ НА СОСТОЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ НО-СИНТАЗНОЙ СИСТЕМЫ В ПОДОСТРОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ**Жуков В.И., Маракушин Д.И., Наконечна О.А., *Вишницкая И.А.***Харьковский национальный медицинский университет; *ГЗ «Луганский государственный медицинский университет»*

Введение. В последние годы в научной литературе появилось большое количество работ о важной роли оксида азота (NO) как полифункционального регулятора структурно-метаболических процессов в организме [1-3]. Согласно современным требованиям, газообразный химический медиатор NO играет универсальную роль модулятора физиологических функций сердечно-сосудистой, нервной, иммунной, мышечной, дыхательной, пищеварительной и других систем организма. Этот медиатор вовлечен и во множество патологических процессов. Он выступает как патогенетический регуляторный и медиаторный фактор формирования нарушений гомеостатической функции организма. Как аутокринная сигнальная молекула, NO участвует в проведении сигнала от мембранных рецепторов к молекулам внутриклеточных структур, в том числе, и по гуанилатциклазному пути. Как паракринный фактор, NO вносит вклад в согласованную работу близлежащих клеток, участвуя в образовании молекулярных систем межклеточной сигнализации [1,2]. Оксид азота отвечает за состояние тонуса сосудов, межклеточную коммуникацию, модуляцию нейротрансмиссии, уровень иммунной цитотоксичности, секрецию медиаторов и гормонов. Вместе с тем, потенциально токсичная молекула NO широко представлена при гипертензии, сахарном диабете, новообразованиях, нейродегенеративных процессах, атеросклерозе, циррозе печени, заболеваниях почек и других патологических состояниях организма. Эта молекула может быть губительной как для клеток, включая раковые, так и для внутриклеточных патогенных микроорганизмов [3]. Установлено, что цитотоксичность NO является результатом образования большого количества этих молекул и инициации процессов апоптоза [1,2]. Двойственность действия NO проявляется в его способности защищать клетки от апоптозных сигналов и вызывать апоптоз. Будет ли молекула NO обладать цитотоксическими функциями или проявится ее цитотоксичность, зависит от типа клетки, фазы ее развития, биоэлектрического потенциала, локальной концентрации NO и других активных форм кислорода (АФК). В последнее время получено много новых данных о метаболизме NO в живой клетке и структуре NO-синтазы. Установлено, что оксид азота действует как важный регулятор таких общих клеточных процессов как экспрессия генов и функциональная активность митохондрий. В организме NO синтезируется из аминокислоты L-аргинина. Этот процесс представляет собой комплексную окислительную реакцию, катализируемую ферментом NO-синтазой (NOS), который является полуфункциональной оксидоредуктазой, напоминающей по ряду свойств систему цитохром P-450 - редуктазу [3,4]. В настоящее время идентифицированы три изофермента NOS, которые названы в соответст-

вии с тем типом клеток, где они были впервые обнаружены: нейрональная (nNOS), индуцибельная (iNOS) или макрофагальная (mNOS), эндотелиальная (eNOS). Все изоформы NOS катализируют образования NO в ответ на рецепторную, химическую, биологическую или физическую стимуляцию [1-6]. Механизм действия этих изоформ ферментов сходен и состоит в следующем: ионы Ca^{2+} под влиянием нейромедиаторных стимулов входят в клетку, где в цитозоле связываются в единый комплекс с кальций связывающим белком - кальмодулином. Комплекс Ca^{2+} -кальмодулин выступает как кофактор, активирует NOS и продукцию NO. Последний, в свою очередь, активирует клеточный цитоплазматический фермент гуанилатциклазу, что приводит к образованию циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ), который опосредует все эффекты NO через сложную систему биохимических реакций, инициируя многочисленные физиологические процессы и развитие патологических состояний [1-4]. Свободный радикал NO в клетке быстро взаимодействует с молекулярным кислородом, супероксидным анион-радикалом и металлами гемсодержащих и негемовых белков. В результате в клетке образуются нитрозильные комплексы гемового и негемового железа. Непосредственно с SH-группами белков взаимодействует NO^+ , который образуется из NO после восстановления или взаимодействия с металлами. В результате в клетке при достаточном количестве металлов под влиянием NO происходит нитрозилирование и изменение активности металлосодержащих белков, а также белков, имеющих активные цистеиновые центры. Регуляция активности белков нитрозилированием – один из способов контроля функции белков в клетке. В случае образования больших количеств NO, последний, под действием NOS может реагировать с супероксидным анионом, образуя другую активную форму кислорода – пероксинитрит ($ONOO^{\cdot}$), который способен вступать в реакцию восстановления с глутатионом и углекислым газом. В этом случае образуется нитрозопероксикарбонат ($ONO_2CO_2^{\cdot}$), способный вызывать химическую модификацию реактивных остатков тирозина в белках, что сопровождается изменением их активности. Кроме этого, токсичный пероксинитрит способен неэнзиматически продуцировать реакционно-способные гидроксильные радикалы (ОН $^{\cdot}$), включая таким образом молекулу NO в образование новых АФК (ОН $^{\cdot}$, NO $^{\cdot}$, $ONOO^{\cdot}$), которые могут окислять белки и липиды, разрушать структуру биологических мембран [4-6]. В основе широкого разнообразия NO-эффектов в клетке лежат изменение редокс-формы молекулы NO, а также дополнительные реакции с металлами, тиолами и остатками тирозина в составе белков. Увеличение количества АФК в клетке может трансформировать эффекты NO из защитных в цитотоксические, которые возникают

не только при индукции NOS эндотоксинами, но и при истощении в клетке резерва тиолов, увеличении концентрации АФК, что приводит к уменьшению скорости нитрозилирования белков[4-8].

Целью работы являлось изучение состояния NO-синтазной окислительной медиаторной системы у белых крыс, подвергавшихся воздействию в подостром токсикологическом эксперименте оксиэтилиро-ванными алкилфенолами и составление прогноза потенциальной опасности для теплокровных животных.

Материалы и методы исследования. Выбор группы веществ – оксиэтилированных алкилфенолов, имеющих товарное название «неонолы» марок АФ9-6, АФ9-10, АФ9-12 обусловлен отсутствием прогностической оценки их для человека и окружающей среды, широким контактом населения с этими веществами и продуктами на их основе, большими объемами производства. На основании параметров острой токсичности «неонолы» АФ9-6, АФ9-10, АФ9-12 относятся к умеренно токсичным соединениям (3 класс опасности), обладающим выраженными кумулятивными свойствами. Среднесмертельные дозы (ДЛ₅₀) определены на уровнях – 4,2±0,5; 4,3±0,4; 3,4±0,62 г/кг массы животного и коэффициенты кумуляции (Кк) на уровнях – 2,26; 3,0; 2,2 соответственно для «неонолов» АФ9-6, АФ9-10, АФ9-12. В экспериментальной части работы использовались половозрелые белые крысы

популяции WAG, массой 185-210 г, которым ежедневно утром с помощью металлического зонда перорально вводились водные растворы неонолов из расчета 1/10; 1/100; 1/1000 ДЛ₅₀. Продолжительность подострого эксперимента составляла 45 суток. Результаты сравнивались с контрольной группой животных, которые получали аналогичные объемы питьевой воды. В контрольной и опытной группах насчитывалось по 8-10 животных. Всего использовано в подостром эксперименте 85 белых крыс с соблюдением закона Украины «О защите животных от жестокого обращения» от 21.02.2006 №3477-IV. Программа исследования NO-синтазной окислительной системы предусматривала определение в сыворотке крови опытных животных продуктов окисления оксида азота: нитритов (NO₂), нитратов (NO₃), S-нитрозотиола, эндотелиальной (eNOS) и индуцибельной (iNOS) NO-синтазы, а также одного из токсичных субстратов окислительного дезаминирования (аминокислот, биогенных моноаминов, амидов аминокислот -L-глутамина, L-аспарагина, пуриновых азотистых оснований и др.), аммиака (NH₃). Состояние окислительной NO-синтазной системы изучалось в соответствии с методическими рекомендациями. Статистическая обработка полученных результатов проводилась на персональном компьютере по программе «Биостатистика» с использованием критерия Стьюдента-Фишера.

Таблица 1. Состояние NO-синтазной окислительной системы под воздействием неонолов в дозе 1/100 ДЛ₅₀ в подостром опыте на крысах

| Показатели | Группа наблюдения, вещества (M±m) | | | |
|----------------------------|-----------------------------------|------------|------------|------------|
| | Контроль | АФ9-6 | АФ9-10 | АФ9-12 |
| NH ₃ (нмоль/л) | 20,6±1,3 | 37,4±2,5* | 36,2±3,1* | 43,5±3,7* |
| NO ₂ (мкмоль/л) | 14,3±1,2 | 19,3±1,7* | 24,6±1,8* | 21,6±1,5* |
| NO ₃ (мкмоль/л) | 25,6±1,7 | 32,8±2,6* | 35,3±2,5* | 42,5±2,2* |
| S-нитрозотиол (ммоль/л) | 0,27±0,04 | 0,39±0,03* | 0,42±0,04* | 0,55±0,06* |
| eNOS (пмоль/мин·мг белка) | 0,52±0,06 | 0,88±0,06* | 0,86±0,05* | 0,89±0,07* |
| iNOS (пмоль/мин·мг белка) | 0,22±0,03 | 0,47±0,05* | 0,53±0,04* | 0,62±0,05* |

Примечание: * p<0,05 по сравнению с контролем.

Результаты и их обсуждение. Изучение состояния NO-синтазной окислительной системы у белых крыс под влиянием неонолов в дозах 1/10 и 1/100 ДЛ₅₀ обнаружило повышение содержания в сыворотке крови метаболитов обмена оксида азота – нитритов, нитратов, S-нитрозотиола и активности эндотелиальной и iNOS на фоне накопления аммиака. Доза 1/1000 не оказывала влияния на обмен NO в опытных группах животных. Результаты анализа выявили накопление в сыворотке крови аммиака под влиянием 1/100 ДЛ₅₀ на 81,5%, 75,7% и 111% соответственно при пероральном воздействии АФ9-6, АФ9-10 и АФ9-12. В этой дозе отмечалось увеличение нитритов на 34,9%, 72%, 51%, нитратов – на 28,1%, 37,8%, 66%, S-нитрозотиола – на 44,4%, 55,5%, 103% соответственно при воздействии неонолов АФ9-6, АФ9-10 и АФ9-12 (табл.1). Исследования обнаружили на фоне повышения содержания в сыворотке крови NH₃, NO₂, NO₃, S-нитрозотиола усиление активности эндотелиальной и индуцибельной

NOS. Так, наблюдалось увеличение активности eNOS на 69,2%, 65,3% и 71,2%, а iNOS – на 113,6%, 140,9% и 181,8% соответственно при действии неонолов АФ9-6, АФ9-10 и АФ9-12.

Динамическое сравнение показателей NO-син-

тазной окислительной системы свидетельствовала о том, что наиболее сильное воздействие на обмен оксида азота оказывает неонол АФ9-12. Эти процессы сопровождалась во всех случаях воздействия 1/10 и 1/100 ДЛ₅₀ развитием эндогенной интоксикации, которая подтверждалась высокими уровнями в сыворотке крови NH₃ и продуктов обмена оксида азота. Предыдущие наши исследования, да и многие другие [3,8,9,10] убедительно показали, что детергенты активируют свободнорадикальные процессы, перекисное окисление липидов, способствуют накоплению в организме перекисей, гидроперекисей, свободных радикалов, АФК, диеновых конъюгатов и малонового альдегида. Повышение активности NOS окислительной системы и содержания продуктов обмена оксида азота под влиянием неонолов АФ9-6, АФ9-10 и АФ9-12 свидетельствует о значительной продукции NO и возможном его участии в развитии патологических состояний. Следует полагать, что оксид азота в органах и тканях может взаимодействовать с АФК, металлами гемовых и негемовых белков с образованием нитрозильных комплексов, взаимодействуя непосредственно со свободными сульфгидрильными группами белков. Эти данные подтверждались существенным повышением под влиянием неонолов S-нитрозотиолов. Во

всех случаях их содержание в сыворотке крови увеличивалось больше, чем на 44% в сравнении с контрольной группой наблюдения. Исследования показывают, что повышение уровней оксида азота, и, как следствие, нитрозилирование белков, а также белков, имеющих активные цистеиновые центры способны изменять их функциональную активность. Вместе с тем, достаточно большое количество в клетке NO может при участии NOS реагировать с супероксидным анионом и приводить к продукции такой АФК как пероксинитрит (ONOO⁻). Усиление этих процессов подтверждалось значительной активацией эндотелиальной NOS и особенно iNOS. Активность iNOS увеличивалась под влиянием неонов АФ9-6, АФ9-10 и АФ9-12 во всех случаях больше чем на 113%. Анализ полученных результатов свидетельствует и о возможности образования такой АФК, как нитрозопероксикарбонат (ONO₂CO₂),

который способен вызывать химическую модификацию и нарушать активность белков, неэнзиматически продуцировать реакционноспособные гидроксильные радикалы, включая, таким образом молекулу NO в образовании новых АФК. Последние, в свою очередь, обладают свойствами окислять белки, липиды, нуклеиновые кислоты, разрушать структуру биологических мембран.

Выводы: Таким образом, результаты подострого опыта обнаружили, что неонолы АФ9-6, АФ9-10 и АФ9-12 в дозах 1/10 и 1/100 ДЛ₅₀ способны активировать NO-синтазную окислительную систему и повышать продукцию активных форм кислорода, что является прогностически неблагоприятным фактором развития свободнорадикальной мембранной патологии, которая лежит в основе формирования многих болезней и патологических состояний.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Гуревич К.Г. Оксид азота: биосинтез, механизмы действия, функция / К.Г. Гуревич, Н.Л. Шимановский // Вопросы биологии, медицины и фармакологической химии. – 2000. - № 4. –С. 16-21.
2. Малышев И.Ю. Введение в биохимию оксида азота. Роль оксида азота в регуляции основных систем организма / И.Ю. Малышев // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. - 1977. - № 1. –С.49-55.
3. Зайцева О.В. Состояние активности NO-синтазы и содержание оксида азота у больных псориазом / О.В. Зайцева, Н.В. Жукова, Е.А. Броше // Вісник проблем біології і медицини. - Полтава, 2002. - № 3. –С. 80-85.
4. Nathan C. Nitric oxide synthases: roles, tools and control / C. Nathan, Q. Xie // Cell. – 1994. – Т. 79. - P. 915-918.
5. Forstermann U. Nitric oxide synthase isozymes, characterization, purification, molecular cloning and function / U. Forstermann, E.I. Closs, J.S. Poilock [et al.] // Hypertension. – 1994. – Т. 23. – P. 1121-1131.
6. Moncada S. Mechanisms of disease: the L-arginine-nitric oxide pathway. / S. Moncada, A. Higgs // New Engl. J. Med. – 1993. – Т. 329. – P. 2002-2012.
7. Dawson V.L. Nitric oxide neurotoxicity / V.L. Dawson, T.M. Dawson // Chem. Neuroanat. – 1996. – V. 3-4. – P. 179-190.
8. Жуков В.І. NO-залежні механізми токсичності синтетичних детергентів / В.І. Жуков, В.В. Мясоедов // Вісник проблем біології і медицини. - Полтава, 2002. - № 9-10. – С. 12-21.
9. Цыганенко А.Я. Научные основы обоснования прогноза потенциальной опасности детергентов в связи с регламентацией в воде водоемов. / А.Я. Цыганенко, В.І. Жуков, Н.Г. Щербань [и др.]. – Белгород, 2001. – 442 с.
10. Щербань Н.Г. Биохимические механизмы радиомиметических эффектов поверхностно-активных веществ / Н.Г. Щербань, В.І. Жуков, В.В. Мясоедов [и др.]. – Харьков: Раритеты Украины. – 2012. – 118 с.
11. «Діагностика ендотеліальної функції – оцінка вазоактивного пулу оксиду азота». Метод. рекомендації МОЗ України. - Київ, 2007. – 20 с.

Жуков В.І., Маракушин Д.І., Наконечна О.А., Вишницкая И.А. Влияние детергентов на состояние окислительной NO-синтазной системы в подостром эксперименте // Український медичний альманах. – 2013. – Том 16, № 1. – С. 133-135.

Изучено влияние неонов на состояние окислительной NO-синтазной системы у белых крыс в подостром эксперименте. Исследуемые детергенты в дозах 1/10 и 1/100 ДЛ₅₀ активируют NO-синтазную окислительную систему и повышают продукцию активных форм кислорода. Это является неблагоприятным фактором развития свободно-радикальной мембранной патологии.

Ключевые слова: неонолы, оксид азота, NO-синтазная система

Жуков В.І., Маракушин Д.І., Наконечна О.А., Вишницка І.А. Вплив детергентів на стан окислювальної NO-синтазної системи в підгострому експерименті // Український медичний альманах. – 2013. – Том 16, № 1. – С. 133-135.

Вивчено вплив неонолів на стан окислювальної NO-синтазної системи у білих щурів у підгострому експерименті. Досліджувані детергенти у дозах 1/10 та 1/100 ДЛ₅₀ активують NO-синтазну окислювальну систему, підвищують продукцію активних форм кисню. Це є несприятливим фактором розвитку вільнорадикальної мембранної патології.

Ключові слова: неонолі, оксид азоту, NO-синтазна система.

Zhukov V.I., Marakushin D.I., Nakonechnaya O.A., Vishnitscaya I.A. The influence of detergents on state of oxidative NO- synthased system in subacute experiment // Український медичний альманах. – 2013. – Том 16, № 1. – С. 133-135.

It was studied the influence of neonols on oxidative NO-synthased system state of white rats during subacute experiment. Investigated detergents in doses 1/10 and 1/100 DL₅₀ stimulate NO-synthased oxidative system and increase the production of active oxygen forms. It is a harmful factor of free radical membrane pathology development.

Key words: neonols, nitric oxide, NO-synthased system.

Надійшла 18.12.2012 р.
Рецензент: проф. Н.К.Казимірко