

© Л.Д. Попова, М.Г. Щербань, І.М. Васильєва

УДК 577.21:577.325:547.422.22-036.7:616-099-092.9

Л.Д. Попова, М.Г. Щербань, І.М. Васильєва

## ОСОБЛИВОСТІ МЕХАНІЗМІВ ТОКСИЧНОЇ ДІЇ ПОЛІЕТИЛЕНГЛІКОЛІВ З РІЗНОЮ МОЛЕКУЛЯРНОЮ МАСОЮ

Харківський національний медичний університет (м. Харків)

Робота виконана у межах науково-дослідної теми ХНМУ «Вивчення механізмів біологічної дії простих полієфірів у зв'язку з проблемою охорони навколишнього середовища» (№ державної реєстрації 0110U001812).

**Вступ.** Поліетиленгліколи (ПЕГ) широко використовуються в різних галузях промисловості в якості як цільових продуктів, так і основних компонентів для отримання цілого ряду хімічних сполук. Це зумовлює широкі масштаби їх виробництва.

Особливу увагу привертає використання ПЕГ у медицині. Поліетиленгліколи використовуються у біології та медицині як криоконсерванти різних біологічних об'єктів (кісткового мозку, крові, кришталіку та ін.), як протектори та пролонгатори лікарських препаратів [12, 13], для очищення білків шляхом фракційної преципітації [10]. Поліетиленгліколи подовжують тривалість життя ліпосом *in vivo* [13]. Використання ПЕГ для захисту лікарських препаратів, зокрема пептидної природи, разом з речовинами, що забезпечують проникність через ГЕБ, дає змогу доставляти пептидні лікарські препарати до головного мозку [10]. Завдяки подовженню тривалості життя поліціаноакрилової часток, система ПЕГ-частки поліціаноакрилової кислоти розглядається як новий засіб транспорту лікарських препаратів до головного мозку [8].

Таке широке використання ПЕГ у медицині зумовлює безпосереднє надходження ПЕГ у невеликій кількості до крові людини, що підвищує значущість досліджень механізмів дії на організм низьких концентрацій цих ксенобіотиків.

Відомо, що головну роль у процесах метаболізму чужорідних сполук відіграє монооксигеназна система (МОС) гепатоцитів, яка здійснює детоксикацію ксенобіотиків шляхом послідовного ряду окислювальних реакцій [5, 9].

Одним із механізмів дії ПЕГ може бути активація вільно радикальних процесів (ВРП) та перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) внаслідок посилення мікросомального окиснення цих речовин.

**Мета дослідження.** Виходячи з особливостей фізико-хімічних властивостей ПЕГ, можна висунути припущення про мембранотропні ефекти досліджувальних речовин, а внаслідок цього про можливість безпосереднього впливу ПЕГ на процеси реплікації, транскрипції і трансляції. У зв'язку з цим, метою роботи було дослідження впливу ПЕГ на стан ПОЛ, а також вивчення впливу ПЕГ на вміст нуклеїнових кислот і білків в органах токсикованих тварин, а також на включення радіоізотопних попередників до ДНК, РНК і білка клітин мишиної мієломи Х-63.

**Об'єкт і методи дослідження.** Робота виконана на 80 щурах популяції Вістар масою 150-180 г і культурі мишиної мієломи Х-63. Водні розчини ПЕГ (Л-502 та Л-2502) у дозі 1/100 ДЛ150 вводили перорально за допомогою зонду. Тривалість введення речовин складала 30 дб.

Утримання тварин та експерименти проводилися відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Стан ПОЛ оцінювали за накопиченням дієнових кон'югатів (ДК) та ТБК-позитивних продуктів ДК виявляли спектрофотометричним методом [4]. Попередню очистку проводили шляхом екстракції гептано-ізопропаноловою сумішшю.

Вміст ТБК позитивних продуктів визначали за допомогою реакції з тіобарбітуровою кислотою, яка за умов високої температури та кислого середовища протікає з утворенням забарвленого комплексу, що має максимум поглинання при довжині хвилі 532 нм [7].

РНК та білки визначали гістохімічними методами. Для виявлення РНК використовували реакцію Браше [2], засновану на здатності РНК утворювати з піроніном забарвлений у червоний колір комплекс. У контрольних зрізах проводили попередній гідроліз РНК за допомогою РНКаз. Визначення білків проводили за допомогою сулемового розчину бромфенолового синього. Білки при цьому набували темно фіолетового кольору. Реакцію проводили з обов'язковим ферментативним контролем (трипсин, пепсин) [2].

Для оцінки ступеня безпосереднього впливу ксенобіотиків на біосинтетичні процеси було досліджено включення радіоізотопних попередників ДНК, РНК та білка у ТХО-нерозчинний осад на культурі клітин мишиної мієломи Х-63. ПЕГ (Л-502, Л-4202) додавали за 1 год до внесення до середовища інкубації радіоактивного попередника. Для дослідження синтезу ДНК використовували 3Н-тимідин (74,0 кБк), РНК - 3Н-уридин (185,0 кБк), білка - 14С-лейцин (92,5 кБк). Включення мітки здійснювали при 37°C і 5 % CO<sub>2</sub> протягом 4 год. Реакцію зупиняли додаванням ТХО до кінцевої концентрації 5 %. Проби оброблювали на нітроцелюлозних фільтрах за загальноприйнятою методикою, радіоактивність вимірювали в толуоловому сцинтиляторі на лічильнику «Бекман-7800». При вивченні впливу ПЕГ на синтез

ДНК і РНК були використані концентрації речовин 50 і 250 мг/л, а на синтез білка – додатково 5 і 25 мг/л.

Результати досліджень та їх обговорення. У процесі експерименту було виявлено, що всі дослідження ПЕГ у дозах 1/10 та 1/100 викликали накопичення у печінці щурів як ДК, так ТБК- позитивних продуктів (рис. 1, 2), що свідчить про активацію ВРП та ПОЛ.

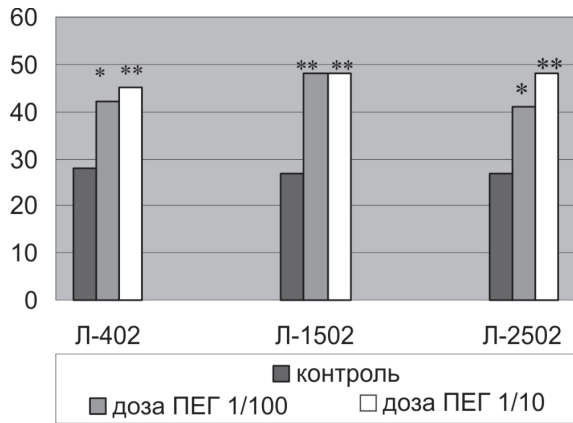


Рис. 1. Вплив ПЕГ на вміст дієнових кон'югатів у печінці щурів.

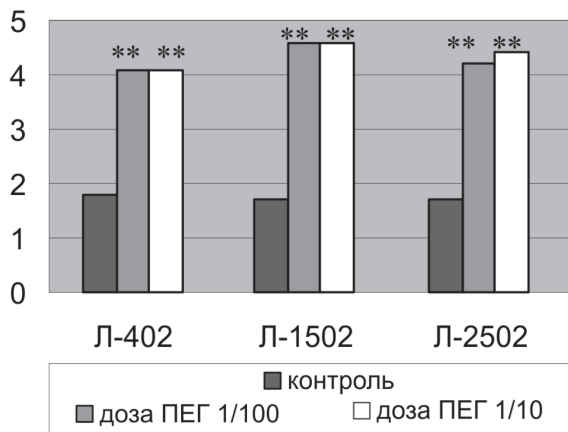


Рис. 2. Вплив ПЕГ на вміст ТБК-позитивних продуктів у печінці щурів.

Активация ПОЛ підтверджується також даними про посилення біохемілюмінесценції сироватки крові та органів токсикованих щурів [6] та результатами спільно гідролітичної та термічної деструкції ПЕГ [3].

Під час гідролітичної та термічної деструкції ПЕГ утворюються вуглеводні (гептан, гексан та ін.) Ці вуглеводні виділяються із сечею токсикованих тварин. Відомо, що коротколанцюгові алкани утворюються внаслідок гідролітичного розкладу гідропероксидів ліпідів, який каталізується іонами металів з перемінною валентністю [1]. Підвищене виділення цих простих вуглеводнів свідчить про посилення ПОЛ.

Дослідження впливу на біосинтетичні показали, що Л-502 впливав на вміст РНК і білка тільки в головному мозку, у той час як Л-2502 з високим ступенем вірогідності зменшував вміст як РНК, так і білка в усіх органах, за виключенням РНК печінки (табл.).

Таким чином, ПЕР впливають на процеси синтезу РНК і білків, проте причиною цього можуть бути не безпосередні ефекти ПЕР, а активація ними вільнорадикальних процесів (ВРП) і посилення процесів ПОЛ [1].

Для того, щоб з'ясувати, чи можуть ПЕР безпосередньо впливати на біосинтетичні процеси, було досліджено їх вплив на включення радіоізотопних попередників до ДНК, РНК і білка клітин мишиної мієломи Х-63. Зважаючи на високу стабільність досліджуваних речовин і короткий інтервал часу попередньої експозиції, можна вважати, що при цьому досліджувався вплив безпосередньо ПЕР, а не продуктів деструкції.

У результаті експериментів виявлено порушення включення до культури клітин 3Н-тимідину, 3Н-уридину і 14С-лейцину (рис.3), що свідчить про безпосередній вплив ПЕГ на синтез ДНК, РНК і білка.

Спостерігається чітка залежність інтенсивності включення мічених метаболітів від дози ПЕГ.

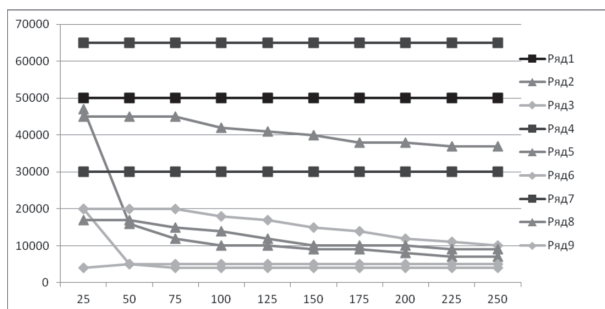
Виявлено різний ступінь гальмування включення 3Н-уридину (доза 50 мг/л, Л-4202, гальмування у 3,6 раз) і 3Н-тимідину (доза 50 мг/л, Л-4202, гальмування у 12,2 разів) до культури клітин. Це дає можливість припустити, що ПЕГ можуть здійснювати ефект на біосинтетичні процеси як шляхом безпосереднього впливу на цитоплазматичну мембрану і зміни

Таблиця

**Вплив поліетиленгліколів на вміст РНК і білка в клітинах різних органів білих щурів, (M±m) од. опт. щільності**

Орган	Контроль	Л-502	Л-2502
<b>Печінка</b>			
РНК	0,154±0,011	0,186±0,010	0,123±0,005
білок	0,247±0,015	0,225±0,012	0,181±0,008**
<b>Канальці нирок</b>			
РНК	0,199±0,009	0,227±0,013	0,087±0,006***
білок	0,282±0,016	0,290±0,014	0,138±0,006***
<b>Нейрополе передніх відділів головного мозку</b>			
РНК	0,105±0,009	0,054±0,008**	0,078±0,004*
білок	0,279±0,009	0,191±0,008***	0,204±0,011***

Примітка: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 – вірогідність різниці між контрольною та дослідною групами.



**Рис. 3.** Вплив поліетиленгліколів на включення ЗН-тимідину (1-контроль, 2- Л-502, 3 – Л-4202); ЗН-уридину (4-контроль, 5 - Л-502, 6 – Л-4202); 14С-лейцину (7-контроль, 8- Л-502, 9 – Л-4202)

її проникності до мічених попередників, так і шляхом впливу на процеси синтезу в клітині.

Оскільки ступінь гальмування ПЕГ включення 14С-лейцину до культури клітин значно перевищує ступінь гальмування цими речовинами включення ЗН-уридину, можна припустити, що ПЕГ впливають на процеси синтезу білка не тільки шляхом зменшення вмісту мРНК, але й в результаті безпосередньої дії на процеси трансляції.

З метою порівняння ефектів ПЕГ на біосинтетичні процеси на рівні культури клітин і організму теплокровних тварин концентрації ПЕГ у середовищі інкубації та дози ксенобіотиків, що вводились до організму щурів, були перераховані в молярні концентрації. Виявилось, що концентрація 50 г/л складала для Л-502 0,1 мМ, для Л-4202 — 0,012 мМ; концентрація 250 г/л — відповідно 0,5 і 0,06 мМ. Для Л-4202 концентрації 0,012-0,06 мМ знаходились у межах максимального ефекту ксенобіотика на біосинтетичні процеси (рис. 3). Молярні концентрації Л-502 у розчині були приблизно в 10 разів більшими за концентрації Л-4202, проте ефект від впливу

цих концентрацій був значно меншим, тобто ПЕГ з більшою молекулярною масою ефективні у більш низьких молярних концентраціях. Ці концентрації відповідають 1/100 ДЛ50 для Л-2502 (0,053 ммоль). Тому навіть за умов неповного впливає на вміст РНК і білка у клітинах тканин (табл.).

Доза 1/100 ДЛ50 складає 0,037 ммоль для Л-502, тобто вона у 3—14 разів менша за дійові концентрації Л-502 на біосинтетичні процеси, навіть якщо допустити стовідсоткове всмоктування ксенобіотика в кишечнику, тому згідно з даними гістологічних досліджень, Л-502 у дозі 1/100 ДЛ50 впливав на вміст РНК і білка лише у головному мозку (табл.).

**Висновки.** Таким чином, у механізмі токсичної дії ПЕГ з високою молекулярною масою важливу роль відіграють безпосередні ефекти ксенобіотиків на біосинтетичні процеси. Дійова молярна концентрація високомолекулярних ПБГ відповідає дозі 1/100 ДЛ50 цих речовин. Для ПЕГ з низькою молекулярною масою переважаючими в механізмах токсичної дії є активація ВРП і ПОЛ. У зв'язку з цим, ДЛ50 цих речовин значною мірою залежить від їхньої стабільності.

Проведені нами дослідження стосовно визначення стабільності та механізмів дії поліетиленгліколів дають змогу дійти висновку, що токсичність ПЕГ залежить від їхньої молекулярної маси, співвідношення мономерних компонентів та сталості. Найменш токсичними серед ПЕГ є речовини, що мають досить невелику молекулярну масу, складаються переважно з молекул етиленгліколю та є стабільними. Саме такі ПЕГ бажано використовувати у фармакологічній промисловості.

**Перспективи подальших досліджень.** У перспективі планується дослідження особливостей впливу ПЕГ з різною молекулярною масою на нейромедіаторні процеси в головному мозку.

### Список літератури

1. Голиков С.Н. Общие механизмы токсического действия / Голиков С.Н., Саночкин И.В., Гиунов Л.А. - Л. : Медицина, 1986. - 276 с.
2. Елисеева В.Г. Гистохимические методы. Основы гистологии и гистологической техники / Под ред. В.Г. Елисеева. - М. : Медицина, 1967. - 267 с.
3. Жуков В.И. Токсиколого-гигиеническая характеристика продуктов гидролитической деструкции полиэтиленгликолей в целях охраны водоемов / Жуков В.И., Пивень В.И., Евдокимов В.И., Попова Л.Д. // Сб. науч. тр. федер. науч. общ. им. Ф. Эрисмана : Основные направления обеспечения гигиенической безопасности населения регионов России. - Самара, 2002. - Ч. 1. - С. 164-169.
4. Косухин Л.Д. Экстракция липидов смесью гептан-изопропанол для определения диеновых конъюгатов / Л.Д. Косухин, Б.С. Ахметова // Лаб. дело. - 1987. - №5. - С. 33-36.
5. Падалко В.И. Влияние длительного введения тироксина на микросомальное окисление в печени крыс разного возраста / В.И. Падалко // Биол. вестник. - 1997. - Т. 1, №1. - С. 40-44.
6. Попова Л.Д. Оценка стабильности биологических мембран методом хемилюминесценции / Л.Д. Попова, С.А. Стеценко // Проблемы криобиологии. - 2001. - №4. - С. 3-8.
7. Федорова Т.Н. Реакция с тиобарбитуровой кислотой для определения МДА крови методом флюоресценции / Т.Н. Федорова, Т.С. Коршунова, Э.Г. Ларский // Лаб. Дело. - 1983. - №3. - С25-28.
8. Calvo P. Long-circulation PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles as new drug carrier for brain delivery / P. Calvo, B. Gouritin, H. Chacun [et al.] // Pharm. Res. - 2001. - Vol. 18, №8. - P. 1157 - 1166
9. Murray R.K. Harper's biochemistry / Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A. - New Jersey : Prentice Hall, 1996. - 868 p.
10. Pardridge W.M. Transport of tryptophan into brain from the circulation albumin - bound pool in rats and in rabbits / W.M. Pardridge, G. Fierer // J. Neurochem. - 1990. - Vol. 54, №3. - P. 971-976.
11. Thrush S.L. Effect of divalent ions on protein precipitation with polyethylene glycol: mechanism of action and applications / S.L. Thrush, J.C. Otto, T.L. Deits // Proteins Expr. Purif. - 1991. - Vol. 2, №1. - P. 83-89

12. Torchilin V.P. Immunoliposomes and PEGylated immuniliposomes: possible use for targeted delivery imaging agents / V.P. Torchilin // Immunomethods. – 1994. – Vol. 4, №3. – P. 244-258.
13. Torchilin V.P. Poly (ethylene glycol) on the liposome surface: on the mechanism of polimercoated liposomes longevite / V.P. Torchilin, V.G. Omelyanenko, M.I. Papisov [et al.] // Biochem. Biophys. Acta. – 1994. – Vol. 1195, №1. – P. 11-20.

**УДК** 577.21:577.325:547.422.22-036.7:616-099-092.9

### **ОСОБЛИВОСТІ МЕХАНІЗМІВ ТОКСИЧНОЇ ДІЇ ПОЛІЕТИЛЕНГЛІКОЛІВ З РІЗНОЮ МОЛЕКУЛЯРНОЮ МАСОЮ**

**Попова Л.Д., Щербань М.Г., Васильєва І.М.**

**Резюме.** На щурах лінії Вістар досліджено вплив ПЕГ на стан перекисного окиснення ліпідів. На культурі клітин Мишиної мієломи Х-63 та щурах лінії Вістар досліджено вплив ПЕГ на синтез нуклеїнових кислот і білка. Виявлено зростання вмісту ДК та ТБК-позитивних продуктів в печінці щурів за умов впливу ПЕГ незалежно від їхньої молекулярної маси. Виявлено зниження включення мічених попередників до ДНК, РНК і білка культури клітин і зменшення вмісту РНК і білка в тканинах щурів за умов впливу досліджених речовин. Припускається, що в механізмах токсичної дії ПЕГ з високою молекулярною масою важлива роль належить їх безпосереднім ефектам на біосинтетичні процеси, а для ПЕГ з низькою молекулярною масою переважаючою в механізмах токсичної дії є активація вільнорадикальних процесів і ПОЛ.

**Ключові слова:** поліетиленгліколи, перекисне окиснення ліпідів, ДНК, РНК, білок.

**УДК** 577.21:577.325:547.422.22-036.7:616-099-092.9

### **ОСОБЕННОСТИ МЕХАНИЗМОВ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЕЙ С РАЗНОЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССОЙ**

**Попова Л.Д., Щербань Н.Г., Васильєва И.М.**

**Резюме.** На крысах линии Вистар исследовано влияние ПЭГ на состояние перекисного окисления липидов. На культуре клеток мышинной миеломы Х-63 и крысах популяции Вистар исследовано влияние ПЭГ на синтез нуклеиновых кислот и белка. Обнаружено повышение содержания ДК и ТБК-позитивных продуктов в печени крыс под влиянием ПЭГ не зависимо от их молекулярной массы. Обнаружено снижение включения меченых предшественников в ДНК, РНК и белки культуры клеток и уменьшение содержания РНК и белка в тканях крыс под влиянием изученных веществ. Предполагается, что в механизмах токсического действия ПЭГ с высокой молекулярной массой важная роль принадлежит их непосредственным эффектам на биосинтетические процессы, а для ПЭГ с низкой молекулярной массой преобладающей в механизмах токсического действия является активация свободнорадикальных процессов и ПОЛ.

**Ключевые слова:** полиетиленглицоли, перекисное окисление липидов, ДНК, РНК, белок.

**UDC** 577.21:577.325:547.422.22-036.7:616-099-092.9

### **Features Of Toxic Action Mechanisms Of Polyethyleneglycols With Different Molecular Mass**

**Popova L.D., N. G. Sherban, Vasil'eva I.M.**

**Summary.** The influence of PEG on the lipid peroxidation in Wistar rats and on the nucleic acids and protein syntheses at the culture of mouse myeloma cells X-63 and Wistar rats was studied. The increase of diene conjugates and TBA-positive products was found in liver of rats after exposure to PEG. The decrease of labeled precursor incorporation into DNA, RNA and protein of cell culture, the diminishing RNA and protein contents in rat tissues were found. It is believed that in mechanism of toxic action of PEG with high molecular mass the direct effects on biosynthetic processes have important role, but in mechanisms of toxic action of PEG with low molecular mass the stimulation of free radical processes and lipid peroxidation prevalates.

**Key words:** polyethyleneglycols, lipid peroxidation, DNA, RNA, protein.

Стаття надійшла 31.01.2012 р.