

**БИОЛОГІЧНІ ЕФЕКТИ 15-КРАУН-5 ПРИ ДІЇ НА АКТИВНІСТЬ СИСТЕМИ
МІКРОСОМАЛЬНОГО ОКИСНЕННЯ ТА ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНІ ПРОЦЕСИ У
ПІДГОСТРОМУ ЕКСПЕРИМЕНТІ**

Харківський національний педагогічний університет імені Г.С. Сковороди (м. Харків)

royalspear@ukr.net

Робота є фрагментом НДР «Механізм біологічної дії ксенобіотиків на організм теплокровних тварин» (№ державної реєстрації 0111U011921).

Вступ. Краун-етери являють собою макрогетероциклічні системи з 9 – 60 атомами в циклі, з яких третину складають атоми етерного кисню, розділені між собою етановими групами [15]. Найбільш важливою властивістю макроциклічних поліетерів є їхня здатність утворювати стійкі комплекси з солями лужних та інших металів, залучаючи катион металу до порожнини своєї молекули [11]. Властивість краун-етерів «коронувати» катіон, а також короноподібна молекулярна структура їх макроцикла були вирішальним фактором для американського хіміка-органіка С.І. Pedersen при підборі назви для цього нового класу синтетичних сполук («crown» – корона) [15]. Разом з відходами хімічного виробництва краун-етери надходять у біосферу та можуть впливати на здоров'я населення. Для більшості представників краун-сполук немає єдиного стандарту щодо гранично-допустимих концентрацій (ГДК) у водних об'єктах та визначення точного механізму їх біологічної дії на організм людини та теплокровних тварин.

Мета дослідження. Вивчити вплив 15-краун-5 на активність системи мітосомального окиснення та вільно-радикальні процеси в організмі щурів у підгострому експерименті.

Об'єкт і методи дослідження. Експеримент проводили на білих щурах-самцях лінії Вістар трьохмісячного віку. 15-краун-5 вводили тваринам щоденно у вигляді водного розчину через зонд у шлунок протягом одного місяця у 1/100 LD₅₀ та 1/1000 LD₅₀, що становило 13,5 та 1,35 мкг/кг. Контрольні тварини отримували водопровідну воду. По закінченню підгострого експерименту щурів обох груп забивали декапітацією гільйотинним ножом, попередньо анестезуючи тіопенталом натрію (50 мг/кг внутрішньопорожнинно) [8].

Проведення експерименту здійснювалось із дотриманням принципів біоетики, що викладені у Хельсінській декларації Всесвітньої медичної асоціації про гуманне ставлення до тварин, а також згідно до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 15.12.2009 р. № 1759-VI та «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Київ, 2001).

Одним із найбільш істотних факторів, що визначають біологічну активність ксенобіотиків, є їхня біотрансформація в організмі [4,7,10]. За своєю молекулярною організацією ферментна система метаболізму ксенобіотиків являє собою вбудований у мембрани ЕПР гепатоцитів електронно-транспортний ланцюг, який є специфічним до НАДФН₂ і залучає до себе, як термінальну ланку, гемопротейн цитохром Р-450. До складу даної системи надходять також цитохром b₅, НАДФН-цитохром Р-450-редуктаза, НАДН-цитохром b₅-редуктаза. Основну роль у метаболізмі ксенобіотиків виконують НАДФН-залежні системи транспорту електронів [1,9]. Стан системи мітосомального окиснення оцінювали за дихальною та ферментативною активністю, вмістом цитохромів b₅ і Р-450. Мембрани ендоплазматичного ретикулуму виділяли за методом Komoth, Narayn [16] у модифікації [12]. Визначення швидкості споживання кисню суспензією мітосом проводили за допомогою закритого платинового кисневого електроду Кларка полярографічним методом [12]. Швидкість окиснення НАДФН₂ визначали за допомогою флюориметричного методу, що базується на вимірюванні швидкості падіння флюоресценції у процесі окиснення. Визначення активності оксидоредуктаз проводили у присутності акцептора електронів – цитохрому с [12]. Принцип методу базується на визначенні зміни поглинання акцептора електронів при переході з окисненої форми у відновлену. Вимірювання швидкості відновлення цитохрому с проводили на двопроменевому спектрофотометрі "Specord UV VIS" (НДР) при 30° С при довжині хвилі 550 нм. Активність оксидоредуктаз розраховували за допомогою коефіцієнта молярної екстинкції цитохрому с, що складав 18,510³ см⁻¹М⁻¹ [12]. Кількісне визначення цитохромів b₅ та Р-450 проводили в суспензії мітосом методом диференційної спектрофотометрії [17], як описано у [12]. При визначенні цитохрому b₅ враховували різницю в поглинанні окисненої та відновленої форми гемопротейнів. При визначенні цитохрому Р-450 вимірювали величину поглинання комплексу відновленого цитохрому Р-450 з монооксидом вуглецю при довжині хвилі 450 нм. Вміст цитохромів визначали за допомогою двопроменевого реєструючого спектрофотометра "Specord UV VIS" (НДР). Для визначення швидкості реакції окислювального деметилювання, субстратом якої був ксенобіотик р-нітроанізол, суспензію мітосом до-

давали у середовище інкубації, ініціюючи її внесенням НАДФН. Зупиняли реакцію додаванням розчину трихлороцтової кислоти. Реакційну суміш обробляли лугами, зсаджували білок центрифугуванням і спектрофотометрично визначали *p*-нітрофенол при довжині хвилі 436 нм на спектрофотометрі СФ-46.

Визначення дієнових кон'югатів є чутливим тестом на наявність у біологічному об'єкті гідропероксидів поліненасичених жирних кислот. Вони виявляються спектрофотометричним методом, бо здатні поглинати в ультрафіолетовій області спектра ($\gamma = 233$ нм). Попередню очистку проводили шляхом екстракції гептано-ізопропаноловою сумішшю [6]. Кількість дієнових кон'югатів розраховували, виходячи із коефіцієнта молярної екстинкції $\epsilon = 2,2 \cdot 10^5$ моль⁻¹·см⁻¹.

Вміст малонового діальдегіду визначали за допомогою реакції між діальдегідом та тіобарбітуровою кислотою, яка за умов високої температури та кисло середовища протікає з утворенням забарвленого комплексу, що має максимум поглинання при довжині хвилі 532 нм [14]. Кількість малонового діальдегіду розраховували, виходячи з молярного коефіцієнта екстинкції $\epsilon = 1,56 \cdot 10^5$ моль⁻¹·см⁻¹.

Утворення активних форм кисню та подальші вільнорадикальні перетворення ліпідів та інших органічних сполук є основою клітинної хемілюмінесценції [13], тому було проведено оцінку спонтанної біохемілюмінесценції (БХЛ) та стимульованої іонами відновленого заліза й пероксидом водню у сироватці крові експериментальних тварин за дії 15-краун-5. Величини цих показників вимірювали на хемілюмінометрі ХЛМЦ1 – 01 [13]. Рівень спонтанної БХЛ характеризує, у першу чергу, інтенсивність вільнорадикального окиснення ліпідів [2,3]. Було досліджено рівень спонтанної хемілюмінесценції гомогенатів головного мозку, печінки та сироватки крові щурів під впливом 15-краун-5. Проби сироватки або гомогенату поміщали до камери, що не пропускає світла, і термостатували при температурі 38°C. Вимірювали фон приладу з пустою кюветою. Потім вимірювали спонтанну БХЛ в дослідній пробі. Для оптимізації умов роботи хемілюмінометру проводили 10 циклів вимірювання фону та сигналу дослідної проби з наступним розрахуванням середніх значень. Інтенсивність спонтанної БХЛ розраховували шляхом віднімання середнього значення фону із середнього значення сигналу дослідної проби.

Методи дослідження процесів перекисного окиснення за допомогою індукованої хемілюмінесценції базуються на активації процесів БХЛ шляхом використання ряду хімічних реагентів [3,13]. Посилення цього процесу надлишком іонів двоцвалентного заліза пояснюється каталізом розщеплення органічних та неорганічних гідропероксидів з утворенням вільних радикалів. У зв'язку з цим, індукована Fe²⁺ БХЛ є відображенням вмісту у системі гідропероксидів. Дослідження Fe²⁺-індукованої хемілюмінесценції проводили на гомогенатах мозку та печінки і у сироватці крові. До оптично прозорої термостатованої при 30°C кювети додавали 3,5 мл 0,020 М фосфатного буферу (рН 7,45), до якого додавали 0,5 мл дослідної сироватки (або гомогена-

ту), після чого перемішували розчин. Одночасно проводили реєстрацію хемілюмінесцентного фону хемілюмінометру при задіафрагмованому ФЕУ. Потім відкривали шторку прибору, через 1 хвилину додавали 1 мл 5·10⁻² М розчину FeSO₄·7H₂O та реєстрували хемілюмінограму протягом 6 хвилин. Далі знову додавали розчин солі заліза та вимірювали хемілюмінесценцію ще 4 хвилини. Після цього закривали шторку і протягом однієї хвилини записували фон прибору.

Система H₂O₂-індукованої БХЛ дозволяє оцінити ефективність генерації, перш за все, гідроксильного радикала з пероксиду водню завдяки реакції Фентона [2,13]. Хемілюмінесценцію, індуковану пероксидом водню, досліджували у сироватці крові та гомогенатах мозку і печінки. До оптично прозорої термостатованої при 30°C кювети наливали 5 мл 0,9% NaCl, потім додавали 0,5 мл дослідної сироватки (або гомогенату), після чого перемішували розчин. Одночасно проводили реєстрацію хемілюмінесцентного фону хемілюмінометру при задіафрагмованому ФЕУ. Потім відкривали шторку прибору, протягом 20 секунд записували спонтанну хемілюмінесценцію, потім додавали 0,25 мл 2% H₂O₂ та реєстрували хемілюмінограму протягом 302 секунд.

Результати дослідження та їх обговорення.

У гепатоцитах щурів за умов впливу 15-краун-5 у 1/100 та 1/1000 LD₅₀ спостерігали статистично достовірне підвищення показників, що характеризують швидкість мікросомального окиснення, порівняно з контролем, як на 15-ту, так і на 30-ту добу експерименту (**табл. 1**). Дія 15-краун-5 також призводила до підвищення швидкості окиснення НАДФН₂ за умов впливу 1/100 та 1/1000 LD₅₀ як на 15-ту, так і на 30-ту добу експерименту (на 122% і 161% (1/100 LD₅₀) та 95% і 93% (1/1000 LD₅₀)) (**табл. 1**).

Про активацію системи мікросомального окиснення в організмі щурів за дії досліджуваної речовини свідчить також достовірне підвищення вмісту цитохрому P-450 як на 15-ту, так і на 30-ту, порівняно з контролем (**табл. 2**) на 92% і 138% відповідно.

Досліджуваний краун-етер не впливав на вміст цитохрому b₅. Це дозволяє вважати, що перенос електронів через цитохром b₅ не являє собою лімітуючу ланку в перетворенні краун-сполук монооксигеназною системою.

Отримані результати корелювали з підвищенням деметилазної активності мікросом. Так, за умов дії 15-краун-5 у 1/100 та 1/1000 LD₅₀ статистично достовірно зростали процеси деметилування на 15 і 30-ту добу експерименту, порівняно з контрольною групою тварин. Досліджувана речовина також статистично достовірно підвищувала НАДФН- і НАДН-цитохром с-редуктазну активність, тим самим чинила вплив на дві електронно-транспортні мікросомальні системи організму експериментальних тварин: НАДФН-цитохром P-450 і НАДН-цитохром b₅ (**табл. 1**).

Таким чином, макроциклічний етер 15-краун-5 в організмі щурів призводив до активації моноокси-

Таблиця 1.

Вплив 15-краун-5 на показники мітросомального окиснення гепатоцитів експериментальних тварин за умов підгострого експерименту ($M \pm m$, $n=10$)

Показник	Доба експерименту	Контроль	15-краун-5	
			1/100 LD ₅₀	1/1000 LD ₅₀
Швидкість споживання кисню ^a	15	1,29±0,10	2,92±0,21*	2,35±0,22*
	30	1,40±0,13	3,72±0,36*	2,81±0,26*
Швидкість окислення НАДФН ₂ ^b	15	3,07±0,24	6,74±0,52*	5,92±0,55*
	30	3,12±0,30	8,14±0,76*	6,03±0,68*
Цитохром P-450 ^c	15	0,86±0,08	1,65±0,15*	1,25±0,10*
	30	0,90±0,08	2,14±0,19*	1,58±0,16*
Цитохром b ₅ ^c	15	0,60±0,03	0,59±0,06	0,58±0,06
	30	0,64±0,05	0,56±0,04*	0,58±0,04
Деметилаза ^d	15	6,02±0,59	12,31±1,01*	10,53±1,10*
	30	6,23±0,60	17,32±1,61*	17,32±1,61*
НАДФН-цитохром c-редуктаза ^e	15	195±20	296±22*	250±23*
	30	202±20	381±37*	271±17*
НАДН-цитохром c-редуктаза ^e	15	937±87	1473±141*	1304±101*
	30	956±90	1619±155*	1405±105*

Примітки: ^a – нмоль O₂/хв-мг білка, ^b – нмоль НАДФН₂/хв-мг білка, ^c – нмоль/мг білка, ^d – нмоль p-нітрофенолу/хв-мг білка, * – p<0,05 відносно контролю.

геназної системи гепатоцитів, як одного з основних генераторів активних форм кисню.

Результати досліджень показали, що на 15-ту і 30-ту добу експерименту досліджувана речовина у 1/100 і 1/1000 LD₅₀ призводила до підсилення процесів ПОЛ, достовірного підвищуючи вміст ДК і МДА у сироватці крові експериментальних тварин (**табл. 2**).

Утворення активних форм кисню та подальші вільнорадикальні реакції ліпідів та інших сполук є основою клітинної БХЛ [2,13], тому нами було проведено оцінку спонтанної БХЛ та БХЛ, стимульованої іонами відновленого заліза Fe²⁺, перекисом водню у тварин за дії 15-краун-5. При вимірюванні спонтанної БХЛ сироватки крові було виявлено, що досліджувана сполука суттєво підвищувала інтенсивність (на 76%), порівняно з контролем. При дослідженні спонтанної БХЛ головного мозку спостерігалось незначне підвищення інтенсивності цього показника (31%). Для печінки інтенсивність спонтанної БХЛ мала тенденцію до достовірного підвищення за умов дії досліджуваної сполуки (**табл. 3**).

Вплив 15-краун-5 на інтенсивність індукованої Fe²⁺ БХЛ сироватки крові призводила до значного підвищення цього показника – на 250% порівняно з

контролем. Підвищення БХЛ гомогенату головного мозку було також суттєвим у тварин експериментальної групи (табл. 3). Для БХЛ гомогенату печінки, досліджувана речовина статистично достовірно підвищувала інтенсивність цього показника – на 100%, порівняно з контролем. Посилення інтенсивності БХЛ надлишком іонів двохвалентного заліза пояснюється каталізом розкладення органічних та неорганічних гідропероксидів з утворенням вільних радикалів і прискоренням вільнорадикального окиснення, тому індукована Fe²⁺ хемілюмінесценція відображає вміст у системі гідропероксидів. Отримані результати свідчать про підвищений вміст гідропероксидів особливо у сироватці крові та печінці експериментальних тварин за дії 15-краун-5 на 30-ту добу спостереження.

Розкладення пероксиду водню в організмі здійснюється завдяки дії каталази, глутатіонпероксидази, у гранулоцитах – за допомогою мієлопероксидази з утворенням гіпохлоритного аніону, а також у реакції Фентона. Реакція Фентона протікає у присутності іонів металів перемінної валентності, зокрема двохвалентного заліза. У процесі цієї реакції пероксид водню розкладається з утворенням вельми реакційноспроможного гідроксильного радикалу [2,3,4].

Таблиця 2.

Вплив краун-етерів на вміст дієнових кон'югатів і малонового діальдегіду в сироватці крові експериментальних тварин ($M \pm m$, $n=10$)

Речовина	Доза, LD50	Дієнові кон'югати		Малоновий діальдегід	
		доба спостереження			
		15	30	15	30
Контроль		2,76±	2,670,18	0,91±	0,94±
15-краун-5	1/100	5,07±	6,820,23*	3,85±	4,32±
	1/1000	4,43±	4,85±	3,04±	3,60±

Примітки: вміст виражений в мкмоль/л; * – p<0,05 відносно контролю.

Таблиця 3.

Вплив 1/1000 LD₅₀ краун-етерів на інтенсивність спонтанної та індукованої Fe²⁺ біохемілюмінесценції сироватки крові та гомогенатів органів в організмі щурів (M±m, n=10)

Речовина	Сироватка крові ^a		Головний мозок ^b		Печінка ^b	
	спонтанна	індукована	спонтанна	індукована	спонтанна	індукована
Контроль	4,12± 0,32	84,3± 8,1	58,82± 5,77	321,4± 33,0	46,72± 4,32	266,1± 25,46
15-краун-5	7,28± 0,71*	295,4± 30,0*	77,32± 7,20*	432,8± 38,5*	87,64± 7,95*	533,2± 48,6*

Примітка: ^a – імпл/с-мл сироватки, ^b – імпл/с-г тканини; * – p<0,05 відносно контролю.

Оскільки вільні радикали утворюються тільки у двох останніх із чотирьох перелічених шляхів, а інтенсивність БХЛ вимірювали у сироватці крові (а вона не має формених елементів) та у гомогенатах печінки і головного мозку, очевидно, зростання інтенсивності БХЛ у разі додавання екзогенного пероксиду водню було відображенням доступності іонів металів з перемінною валентністю, зокрема, наявності Fe²⁺. Це припущення співпадає з літературними даними [13], в яких вважається, що система H₂O₂-індукованої БХЛ дозволяє оцінити ефективність генерації, перш за все, OH⁻ – радикала з пероксиду водню, завдяки реакції Фентона. Результати експериментів свідчать про підвищену доступність іонів металів з перемінною валентністю особливо у сироватці крові та печінці за дії 15-краун-5 на 30-ту добу експерименту (табл. 4).

експериментальних тварин, що може бути пов'язано або з більшою концентрацією негемового заліза, або з більшою спроможністю до відновлення заліза.

Молекулярні механізми біологічної дії ксенобіотиків включають два взаємопов'язаних процеси: пошкоджуючи дію токсинів і компенсацію порушень, спрямованих на підтримку гомеостазу. Компенсаторні процеси в хімічній патології поділяються на два типи: перший включає механізми, пов'язані з функціонуванням монооксигеназних систем гладкого ендоплазматичного ретикулулу й супряженою з ними реакцією кон'югації [1]. Це в основному механізми детоксикації ліпотропних сполук. Другий тип поєднує молекулярні механізми, локалізовані у цитозолі, мітохондріях, пероксисомах і лізосомах. Це механізми детоксикації водорозчинних сполук [4].

Результати експериментів демонструють підси-

Таблиця 4.

Вплив 1/1000 LD₅₀ краун-етерів на інтенсивність спонтанної та індукованої пероксидом водню хемілюмінесценції сироватки крові та гомогенатів органів в організмі щурів (M±m, n=10)

Речовини	Сироватка крові ^a		Головний мозок ^b		Печінка ^b	
	спонтанна	індукована	спонтанна	індукована	спонтанна	індукована
Контроль	4,12±0,32	415,6±40,5	58,82±5,77	3158±225	46,72±4,32	2614±217
15-краун-5	7,28±0,71*	728,3±70,9*	77,32±7,20*	4028±401*	87,64±7,95*	3981±377*

Примітка: ^a – імпл/с-мл сироватки, ^b – імпл/с-г тканини; * – p<0,05 відносно контролю.

Біохімічні механізми ініціації, розгалуження та гальмування ланцюгових реакцій у біологічному середовищі включають іони негемового заліза, які мають неспарений електрон, як необхідний компонент цих процесів [2]. З одного боку, іони Fe²⁺ сприяють активації перекисного окиснення ліпідів, шляхом утворення нових ланцюгів завдяки взаємодії з гідропероксидами ліпідів та генерації гідроксильного радикала у реакції Фентона [3,13]. З іншого боку, Fe²⁺ може взаємодіяти з радикалами, приводячи до обриву ланцюга. При низьких концентраціях гідропероксидів та надлишку іонів Fe²⁺ з більшою вірогідністю будуть відбуватися реакції з участю радикалів, тобто іони Fe²⁺ будуть виступати у якості антиоксидантної системи. У разі рівних або близьких концентрацій у клітині гідропероксидів та іонів заліза, іони Fe²⁺ виконують роль сильного каталізатора процесів ПОЛ [2]. Таким чином, концентрація іонів Fe²⁺ є фактом, спроможним регулювати процес пероксидації ліпідів. Дані, що характеризують H₂O₂-індуковану БХЛ, свідчать про більшу ефективність генерації OH⁻-радикала з пероксиду водню завдяки реакції Фентона у печінці

лання процесів мікросомального окиснення в печінці тварин, що підтверджується збільшенням швидкості споживання кисню мікросомами, швидкості окиснення НАДФН₂, зростанням деметилазної, НАД(Ф)Н-цитохром с-редуктазної активності, підвищенням вмісту цитохрому Р-450. Урахування часових характеристик динаміки зміни цих показників дозволяє зробити висновок про індукований біосинтез мікросомальних ферментів монооксигеназної системи. 15-краун-5 можна віднести до індукторів мікросомальних монооксигеназ широкого спектру дії; він здатен прискорювати біотрансформацію численних ксенобіотиків, збільшуючи вміст й активність цитохрому Р-450, а також активуючи НАДФН-цитохром Р-450-редуктазу. Підсилення цитохромредуктазної активності мікросомальної фракції печінки експериментальних тварин внаслідок індукуючої дії краун-етеру призводить до „напруження” системи біотрансформації ксенобіотиків.

Активация монооксигеназної системи гепатоцитів супроводжується, як правило, генерацією суперок-

сидних радикалів, перекису водню, органічних перекисів, посиленням перекисного окиснення ліпідів [2].

Утворення з поліненасичених жирних кислот речовин з супряженими подвійними зв'язками – дієнових кон'югатів – є одним з основним критеріїв вільнорадикального окиснення. Утворення дієнів, а потім гідроперекисів ліпідів у біомембранах сприяє виникненню в гідрофобному ліпідному бішарі гідрофільних кластерів, у які може проникати вода, сприяючи розривленню мембрани, а також Fe^{2+} , що може індукувати реакцію розгалуження ланцюгів і посилення перекисного окиснення ліпідів.

Малоновий діальдегід, один з вторинних продуктів ПОЛ, є поперечно-зшиваючим біфункціональним реагентом, що може взаємодіяти з аміно-вмісними біомолекулами (амінокислотами, білками, нуклеотидами, нуклеїновими кислотами, аміновмісними вуглеводами й ліпідами) з утворенням високомолекулярних продуктів з внутрішньо- та міжмолекулярними зшивками типу Шиффових сполук. Малоновий діальдегід розглядається як одна з молекул „дистант-

ної дії”, яка завдяки своїй стабільності проникає в усі структури клітини, віддалені від місця утворення, з наступним їх пошкодженням [14].

Висновки

1. Досліджуваний 15-краун-5 підсилює процеси мікросомального окиснення за рахунок підвищення швидкості споживання кисню, окиснення НАДФН₂, індукованого біосинтезу цитохрому Р-450.

2. Продукти біотрансформації краун-етеру дозозалежно підсилюють процеси вільнорадикального окиснення, що проявляється в активації перекисного окиснення ліпідів (накопичення дієнових кон'югатів та малонового діальдегіду), підвищенні рівня біохемілюмінесценції.

Перспективи подальших досліджень. В подальшому було б цікаво дослідити вплив краун-сполук на фосfolіпідний склад, рецепторний апарат мембран клітин та пострецепторну ланку трансмісії внутрішньоклітинного сигналу в організмі теплокровних тварин.

Література

1. Archakov A.I. Mikrosomalnoe okislenie / A.I. Archakov. — М.: Nauka, 1975. — 327 s.
2. Baraboy V.A. Okislitelno-antioksidantnyi homeostaz v norme i patologii / V.A. Baraboy, D.A. Sutkovoy. — К.: Naukuva Dumka, 1997. — 420 s.
3. Vladimirov Yu.A. Otsenka antiokislitelnoy i antiradikalnoy aktivnosti veshstv i biologicheskikh ob'ektov s pomosh'iu zhelezoinitsirovanoj hemiliuministsentsii / Yu.A. Vladimirov, M.P. Sherstnev, T.K. Azimbaev // Biofizika. — 1992. — № 6. — S. 1041-1047.
4. Zhukova T.V. Adaptatsionnye reaktsii organizma kak kriterii reglamentatsii himicheskikh zagriazniteley okruzhayushey sredy / T.V. Zhukova // Gigiena i sanitaria. — 1997. — № 6. — S. 66-68.
5. Kagan V.E. Izuchenie mehanizma fermentativnogo NADPH-zavisimogo perekisnogo okislenia lipidov v membranah endoplazmaticheskogo retikuluma / V.E. Kagan, E.M. Serbinova, A.A. Minin // Biohimiya. — 1985. — № 6. — S. 986-991.
6. Kauhina A.B. Ekstraktsia lipidov smes'iu heptan-izopropanol dlia opredelenia dienovykh kon'ugatov / A.B. Kauhina, B.S. Ahmetova // Lab. Delo. — 1987. — № 6. — S. 335-337.
7. Lakin K.M. Biotransformatsia lekarstvennykh veshstv / K.M. Lakin, Yu.F. Krylov. — М.: Meditsina, 1981. — 304 s.
8. Lang S.M. Laboratornaya krysa / S.M. Lang, R.P. Wilson // Laboratornye zhivotnye. — 1993. — № 2. — S. 101-110.
9. Lemeshko V.V. Sistema mikrosomalnogo okislenia pri razvitii i starenii organizma / V.V. Lemeshko // Biohimia. — 1980. — № 11. — S. 1964-1969.
10. Lutsevich I.N. Izuchenie toksichnosti produktov transformatsii himicheskikh veshstv v usloviyah ostrogo opyta / I.N. Lutsevich // Zdorov'e naselenia i okruzhayushaya sreda. — Saratov: SGU, 1986. — S. 68-70.
11. Maksjutina N.P. Perspektivy primeneniya kraun-efirov dlia ekstraktsionno-fotometricheskogo opredelenia shelochnykh metallov v lekarstvennykh preparatah / N.P. Maksjutina, P.A. Vetiutneva, A.Yu. Nazarenko, F.A. Mitchenko // Farmakologicheskii zhurnal. — 1991. — № 3. — S. 67-74.
12. Orekhovich V.N. Sovremennye metody v biologii / V.N. Orekhovich. — М.: Meditsina, 1977. — 371 s.
13. Popova L.D. Otsenka stabil'nosti biologicheskikh membrane metodom hemiliuministsentsii / L.D. Popova, S.A. Stetsenko // Problemy kriobiologii. — 2001. — № 4. — S. 3-7.
14. Fedorova T.N. Reaktsii s tiobarbiturovoy kislotoy dlia opredelenia malonovogo dial'degida krovi metodom fluorimetrii / T.N. Fedorova, T.S. Korshunova, E.G. Larskiy // Lab. Delo. — 1983. — № 3. — S. 25-28.
15. Hiraoka M. Kraun-soedinenia, svoistva i primeneniya / M. Hiraoka. — М.: Mir, 1986. — 277 s.
16. Komoth S.A. Interaction of Ca^{2+} with endoplasmic reticulum of rat liver: A standardized procedures for isolation of rat liver microsomes / S.A. Komoth, K.A. Narayan // Anal. Biochem. — 1972. — № 1. — P. 53-61.
17. Omura T. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. Evidence for its hemoprotein nature / T. Omura, R. Sato // Biol. Chem. — 1964. — № 1. — P. 2370-2378.

УДК 613-615.092.044:616.099.036

БІОЛОГІЧНІ ЕФЕКТИ 15-КРАУН-5 ПРИ ДІЇ НА АКТИВНІСТЬ СИСТЕМИ МІКРОСОМАЛЬНОГО ОКИСНЕННЯ ТА ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНІ ПРОЦЕСИ У ПІДГОСТРОМУ ЕКСПЕРИМЕНТІ

Кратенко Р. І.

Резюме. В статті представлені результати біологічної дії 15-краун-5 на систему мікросомального окиснення та вільнорадикальні процеси. Експеримент проводили на білих щурах-самцях лінії Вістар трьохмісячного віку. 15-краун-5 вводили тваринам щоденно у вигляді водного розчину через зонд у шлунок протягом одного місяця у $1/100 LD_{50}$ та $1/1000 LD_{50}$, що становило 13,5 та 1,35 мг/кг. Контрольні тварини отримували водопровідну воду. Досліджуваний 15-краун-5 активував процеси мікросомального окиснення за рахунок підвищення швидкості споживання кисню, окиснення НАДФН₂, індукованого біосинтезу цитохрому Р-450. Продукти біотрансформації краун-етеру дозозалежно підсилювали процеси вільнорадикального окиснення, що проявлялося в активації перекисного окиснення ліпідів (накопичення дієнових кон'югатів та малонового діальдегіду), підвищенні рівня біохемілюмінесценції.

Ключові слова: 15-краун-5, мікросомальне окиснення, вільно радикальне окиснення, малоновий діальдегід, дієнові кон'югати, біохемілюмінесценція.

УДК 613-615.092.044:616.099.036

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ 15-КРАУН-5 ПРИ ДЕЙСТВИИ НА АКТИВНОСТЬ СИСТЕМЫ МИКРОСОМАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ И СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ В ПОДОСТРОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Кратенко Р. И.

Резюме. В статье представлены результаты биологического действия 15-краун-5 на систему микросомального окисления и свободнорадикальные процессы. Эксперимент проводили на белых крысах-самцах линии Вистар трехмесячного возраста. 15-краун-5 вводили животным ежедневно в виде водного раствора через зонд в желудок на протяжении одного месяца в $1/100 LD_{50}$ та $1/1000 LD_{50}$, что составляло 13,5 та 1,35 мг/кг. Контрольные животные получали водопроводную воду. Исследуемый 15-краун-5 активировал процессы микросомального окисления за счет повышения скорости потребления кислорода, окисления НАДФН₂, индуцированного биосинтеза цитохрома P-450. Продукты биотрансформации краун-эфира дозозависимо усиливали процессы свободнорадикального окисления, что проявлялось в активации перекисного окисления липидов (накопления диеновых конъюгатов и малонового диальдегида), повышении уровня биохемілюмінесценції.

Ключевые слова: 15-краун-5, микросомальное окисление, свободнорадикальное окисление, малоновый диальдегид, диеновые конъюгаты, биохемілюмінесценція.

UDC 613-615.092.044:616.099.036

BIOLOGICAL EFFECTS OF 15-CROWN-5 INFLUENCING ON MICROSOMAL OXIDATION SYSTEM ACTIVITY AND FREE-RADICAL PROCESSES AT SUB-ACUTE EXPERIMENTS

Kratenko R. I.

Abstract. Crown-ethers structure is represented by macroheterocyclic systems with 9-60 atoms in the cycle. One third of the atoms are etherized oxygens which are separated by ethane groups. The most important property of macrocyclic polyethers is their capacity of forming stable complexes with salts of alkaline and other metals including the metal cation to their molecular niche.

Objective. Investigation of 15-crown-5 influence upon microsomal oxidation system activity and free-radical processes in the rat organism at conditions of sub-acute experiments.

Object and methods. The experiments were performed using Vistar line white rats (three month of age). The experimental animals were administered with 15-crown-5 (water solution) within one month (daily) per orally in $1/100$ and $1/1000 LD_{50}$ (13.5 and 1.35 mg/kg). The control group of animals was given water. The state of microsomal oxidation was evaluated by respiratory and enzymes activity and cytochromes P₄₅₀ and b₅ contents. The contents of dienic conjugates and malonic dialdehyde as well as the measurement of tissue biochemiluminescence levels signified the development of free-radical oxidation and lipid peroxidation.

Investigation results and their discussion. 15-crown-5 $1/100$ та $1/1000 LD_{50}$ action resulted in the elevation of NADPH₂ oxidation velocity and cytochrome P₄₅₀ contents on 15th and 30th experimental days (by 100-110 % on average). The investigated crown-ether did not influence cytochrome b₅ contents, which allows suggesting the latter not to be the limiting link in crown-ethers biotransformation by monooxygenase system. The obtained results correlated with the increase in demethylase activity of microsomes. The investigated crown-ether also significantly induced NADPH- and NADH-cytochrome c-reductase activity, and, thus, influenced two electron-transport microsomal chains of experimental animals organism. 15-crown-5 $1/100$ and $1/1000 LD_{50}$ action resulted in the augmentation of lipid peroxidation pronouncedly increasing dienic conjugates and malonic dialdehyde contents in blood serum of experimental animals. The measurement of spontaneous biochemiluminescence (BCL) displayed the crown-ether to increase this index in blood serum (by 76%) and brain (by 31%) compared with the control magnitudes. The xenobiotics did not alter the in the liver of experimental animals though. Fe²⁺-induced BCL of blood serum got elevated by 250%, and of brain and liver – by 65 and 100% respectively in the action of 15-crown-5.

The experimental results demonstrate enhancing the processes of microsomal oxidation in the animals liver, and taking into consideration the dynamics of the indexes alterations, one could draw a conclusion about the induction of monooxygenase system enzymes synthesis by 15-crown-5. The stimulation of liver microsomal fraction cytochrome reductase activity leads to straining the xenobiotics biotransformation system. Activation of hepatocyte monooxygenase system is accompanied, as a rule, by generation of superoxide radicals and enhancing lipid peroxidation. Formation of substances with paired double bonds (dienic conjugates) facilitates appearance of hydrophilic clusters in the continuous hydrophobic lipid bilayer, in which water and iron ions may penetrate. The former could stimulate the membrane destabilization; the latter might induce the reaction of branching the fatty acid residues chains, and stimulate lipid peroxidation further on. Malonic dialdehyde may be considered as a molecule of distant action, which, due to its stability, penetrates almost all of cellular structures, bringing up their following destruction.

Conclusions

1. 15-crown-5 activates microsomal oxidation processes by increasing oxygen consumption velocity, NADPH₂ oxidation, and cytochrome P₄₅₀ inductive synthesis.

2. The crown-ether biotransformation products dose-dependently enhance processes of free radical oxidation, which was revealed as lipid peroxidation activation (malonic dialdehyde and dienic conjugates accumulation), and biochemiluminescence induction.

Keywords: 15-crown-5, microsomal oxidation, free-radical oxidation, malonic dialdehyde, dienic conjugates, biochemiluminescence.

Рецензент — проф. Непорада К. С.

Стаття надійшла 10.06.2017 року