

УДК 577.124.5:616.36-018.1-092.9-099:543.395

<https://orcid.org/0000-0003-1286-2962>

АКТИВНІСТЬ ГЛЮКУРОНОВОГО ШЛЯХУ КОН'ЮГАЦІЇ У ПЕЧІНЦІ ЩУРІВ ЗА ДІЇ ОЛІГОЕФІРІВ БАГАТОАТОМНИХ СПИРТІВ

Бондарева А.В., *асистент*, Комаревцева І.А., *проф.*, *д.м.н.*
Харківський національний медичний університет, Харків, Україна
Bondareva.alla@i.ua

До числа розповсюджених на даний час факторів довкілля, які здатні проявляти негативний вплив на організм людини та тварин, відносяться чужорідні хімічні речовини, які називають «ксенобіотики». Більшість ксенобіотиків при надходженні до організму не чинять прямого біологічного ефекту, так як піддаються знешкодженню. До числа невивчених у цьому плані КБ відносяться олігоефіри багатоатомних спиртів технічної назви «Лапроли» (ОЕФ-ЛП), для яких характерні досить значні об'єми синтезу, широке використання (як основи промислового випуску пластмас, пінополіуретанів, лакофарбних матеріалів, миючих засобів, гідравлічних та охолоджуючих речовин тощо), надходження до джерел питного водопостачання населення та завдяки цьому можливий вплив на здоров'я людини.

В ході дослідження було встановлено, що у печінці щурів відбувається активація глюкуронового шляху кон'югації при 15-добовому пероральному введенні досліджуваних ОЕФ у дозі 1/10 ЛД50 з наступним його інгібуванням. У випадку введення щурам речовин у дозі 1/100 ЛД50 активація глюкуронової кон'югації спостерігається протягом 30-ти діб з наступним її зниженням. Порушення процесів кон'югації є однією з патогенетичних ланок механізмів дії ОЕФ-ЛП, що необхідно враховувати при розробленні засобів їх корекції. У подальшому планується продовжити комплекс досліджень, спрямованих на обґрунтування впливу речовин на організм теплокровних тварин з метою визначення їх потенційної небезпеки та нормування.

Ключові слова: ксенобіотики, глюкуроновий шлях кон'югації, олігоефіри багатоатомних спиртів, УДФ-глюкуронілтрансфераза, глюкуроніди.

Activity way of conjugation in rat liver under the action of oligoerd polyhydric alcohols.

Bondareva A.V., Komarevtseva I.A. - Among the currently common environmental factors which are able to show a negative impact on humans and animals, are alien chemicals which called "xenobiotics". Most xenobiotics when getting the body do not have a direct biological effect, as exposed disposal. Among unexplored xenobiotics we can meet polyhydric alcohols olygoesters technical name "Laproyl." They are characterized by large volumes of chemicals, widely used in industry. They come to water sources and affect human health.

The research task was to determine the activity of UDP-glucuronyltransferase in rats' liver content glucuronic acid and total glucuronides. Also assess the impact OEF-LP marks 502 and 503 at doses of 1/10 and 1/100 LD50 to glucuronic way of conjugation. The study uses examples OEF-LP 502 marks (polyoksypropilenglikol) and 503 (polyoksypropilentryol) with regulated physicochemical characteristics. Experiments conducted on mature rats of Wistar weighting 180-220 g. The animals received water solutions of OEF once daily for 45 days at doses of 1/10 and 1/100 LD50. The animals in the control group receive the appropriate amounts of drinking water. Studies conducted in the dynamics of observation: 15, 30, 45th day after the start of the experiment.

The results indicate activation of glucuronic conjugation in the liver of rats during the first 15 days of oral investigated OEF in doses 1/10 LD50 followed his inhibition. Activation of

glucuronic conjugation occurs when rats received the substances in 1/100 LD50 dose for 30 days. It is proved that in various forms of liver failure it is possible to decrease the synthesis of glucuronic acid. This in turn causes metabolic imbalance and strengthen the development of the pathological process. Previous studies have established the formation of ketones and alcohols as biotransformation products studied oligoesters, who also have the ability to react conjugation with glucuronic acid. These products revealed the presence in urine of experimental animals on the 60th day oral oligoesters demonstrates the impossibility of their disposal in rats' liver as a result of the likely path of inhibition of glucuronic conjugation.

Conclusions:

1. In the event of the introduction of substances in rats LD50 dose 1/100 activated glucuronic conjugation occurs within 30 days (most pronounced during the first 15 days), followed by its decline.

2. Glucuronic conjugation activation observed during 30 days in the case of the introduction of substances in rats in dose LD50 1/100.

3. Disruption of conjugation is one of the pathogenic mechanisms of OEF-LP. This should be considered when developing a means of correction.

Key words: xenobiotics, glucuronic conjugation pathway, oligoesters, polyols, UDP-glucuronyltransferase, glucuronides.

ВСТУП

До числа розповсюджених на даний час факторів довкілля, здатних проявляти негативний вплив на організм людини та тварин, відносяться чужорідні хімічні речовини, які звичайно розглядають під терміном «ксенобіотики» (КБ) [2, 7]. Доведено, що більшість КБ при надходженні до організму не чинять прямого біологічного ефекту, так як спочатку піддаються знешкодженню. Під останнім, як правило, розуміють складний багатостадійний процес, в який залучено цілу низку певних речовин [5]. До серйозних недоліків системи знешкодження КБ відносять, по-перше, її реалізацію по відношенню до будь-яких молекул, у тому числі й життєво необхідних для організму (наприклад, медіаторів, гормонів, метаболітів тощо). По-друге, у деяких випадках метаболіти КБ становляться, навпаки, більш токсичними сполуками, а також можуть змінити характер токсичної дії або ініціювати інший токсичний процес. Останнє є вагомим фактором ризику хімічного пошкодження важливих біомолекул, зокрема, білків та нуклеїнових кислот з втратою їх функціонального призначення [9]. До числа невивчених у цьому плані КБ відносяться олігоєфіри багатоатомних спиртів технічної назви «Лапроли» (ОЕФ-ЛП), для яких характерні досить значні об'єми синтезу, широке використання (як основи промислового випуску пластмас, пінополіуретанів, лакофарбних матеріалів, миючих засобів, гідравлічних та охолоджуючих речовин тощо), надходження до джерел питного водопостачання населення та завдяки цьому можливий вплив на здоров'я людини [3, 4].

Метою дослідження було оцінити вплив ОЕФ-ЛП марок 502 і 503 у дозах 1/10 і 1/100 ЛД50 на глюкуроновий шлях кон'югації шляхом визначення у печінці щурів активності УДФ-глюкуронілтрансферази, вмісту глюкуронової кислоти та загальних глюкуронідів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

У роботі використано зразки ОЕФ-ЛП марок 502 (поліоксипропіленгліколь) і 503 (поліоксипропілентриол) з регламентованими фізико-хімічними характеристиками. Експерименти проведено на статевозрілих щурах-самцях лінії Wistar вагою 180-220 г. Утримання та маніпуляції над тваринами виконувались відповідно до основних принципів біоетики. Тварин піддавали пероральній затравці за допомогою зонда водними розчинами ОЕФ щоденно одноразово протягом 45 діб у дозах 1/10 і 1/100 ЛД50. Середньолетальні дози (ЛД50) становили для ОЕФ-ЛП-502 - 1,83 г/кг; ОЕФ-ЛП-503 - 21,3 г/кг маси. Тваринам контрольної групи вводили відповідні об'єми питної води. Дослідження показників проводили у динаміці спостереження: на 15, 30, 45-ту добу після початку експерименту. У кожній групі було по 10 тварин. Щурів декапітували, попередньо анестезуючи тіопенталом натрію у дозі 50 мг/кг маси. Для виділення печінки тварин після декапітації фіксували на препарувальному столику та розрізали черевну порожнину. Печінку перфузували охолодженим 1,15% розчином калію хлориду до повного видалення слідів крові, видаляли, вирізали ділянки сполучної тканини, просушували на фільтрувальному папері. Для отримання гомогенату наважку тканини подрібнювали на холоді та гомогенізували протягом 1-2 хв. за допомогою скляного гомогенізатору Поттера з тефлоновим товчачиком в охолодженому середовищі виділення (співвідношення тканина/середовище становило 1г/3 мл). Гомогенат центрифугували 25 хв. при 8 000 g з метою осадження мітохондрій, ядер, лізосом і незруйнованих клітин. Виділення мікросомної фракції проводили за практичними рекомендаціями [10]. До супернатанту додавали осаджуючий розчин, центрифугували 15 хв. при 1 500 g, ресуспендірували у середовищі виділення. Чистоту мікросомної фракції тестували за маркерними ферментами [6]. Активність УДФ-глюкуронілтрансферази (КФ 2.4.1.17) (УДФ-ГТ) мікросомної фракції печінки визначали за швидкістю кон'югації *n*-нітрофенолу з використанням у кінцевій концентрації 0,005 % тритону-Х-10 (для виявлення латентної активності) [8]. Вміст глюкуронової кислоти (ГК) у гомогенаті печінки оцінювали за карбазольною реакцією Дише з попереднім осадженням етанолом і відділенням від білків трихлороцтовою кислотою [1]. Рівень загальних глюкуронідів (ЗГ) визначали колориметрично з використанням карбазолу [12]. Порівняння середніх величин у вибірках з нормальним розподілом проводили за *t*-критерієм Стюдента. За критичний рівень значущості приймали $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На 15-ту добу спостереження у мікросомній фракції печінки щурів виявлено вірогідне ($p < 0,05$) при зіставленні з контролем підвищення активності УДФ-ГТ на 68 і 35 % відповідно для ОЕФ-ЛП-502 і ОЕФ-ЛП-503 у дозі 1/10

ЛД50. На 30 і 45-ту добу експерименту пероральне введення шурам речовин у цій дозі, навпаки, сприяло статистично значимому по відношенню до контролю зниженню активності фермента на 12 і 28,5 % у випадку ОЕФ-ЛП-502, на 28 і 31 % у випадку ОЕФ-ЛП-503 (табл.1). Дія ОЕФ у дозі 1/100 ЛД50 виявилася інакшою. На 15 і 30-ту добу спостереження у мікросомній фракції гепатоцитів спостерігалось вірогідне ($p < 0,05$) по відношенню до контролю підвищення активності УДФ-ГТ: для ОЕФ-ЛП-502 відповідно на 73 і 21 %, для ОЕФ-ЛП-503 – на 35 і 27 %. На 45-ту добу введення речовин визначалося зниження ($p < 0,05$) активності УДФ-ГТ у середньому на 27-30 %.

Таблиця 1

Активність УДФ-глюкуронілтрансферази у мікросомній фракції печінки, вміст глюкуронової кислоти та глюкуронідів у печінці щурів при пероральному введенні олігоефірів багатоатомних спиртів технічної назви «Лапроли» марок 502 і 503 ($M \pm m$)

Група тварин (n=10)	УДФ-глюкуроніл-трансфераза, нМ/мг білка·хв			Глюкуронова кислота, мг/г тканини			Загальні глюкуроніди, мкМ/г тканини		
	доба спостереження								
	15	30	45	15	30	45	15	30	45
Контроль	3,03± 0,10	3,39± 0,11	2,88± 0,09	38,6± 1,15	41,1± 1,19	40,7± 0,95	102± 1,36	98,0± 1,17	103± 1,23
1/10 ЛД50 ЛП-502	5,08± 0,11*	2,97± 0,14*	2,06± 0,11*	30,6± 1,15*	50,5± 1,18*	51,9± 1,09*	111± 0,98*	89,8± 0,88*	84,9± 1,79*
1/10 ЛД50 ЛП-503	4,10± 0,11*	2,45± 0,08*	2,01± 0,09*	31,8± 0,91*	52,5± 0,88*	50,5± 0,83*	109± 0,90*	90,2± 1,28*	87,2± 1,40*
1/100 ЛД50 ЛП-502	5,23± 0,14*	4,11± 0,12*	2,11± 0,09*	29,1± 0,86*	28,7± 0,99*	49,3± 1,03*	103± 0,93	115± 1,03*	90,6± 1,12*
1/100 ЛД50 ЛП-503	4,08± 0,11*	4,30± 0,13*	2,01± 0,08*	30,6± 0,87*	35,7± 1,02*	52,1± 0,81*	101± 0,86	112± 1,03*	89,9± 1,07*

Примітка: * - $p < 0,05$ по відношенню до контролю

У печінці щурів на 15-ту добу дії ОЕФ у дозі 1/10 ЛД50 спостерігалось вірогідне ($p < 0,05$) при порівнянні з контролем зниження вмісту ГК у середньому на 18-21 % (див. табл.1). На 30 і 45-ту добу експерименту рівень ГК, навпаки, підвищувався в середньому на 23-27 % (див. табл. 1). Пероральне введення шурам ОЕФ у дозі 1/100 ЛД50 сприяло статистично значимому ($p < 0,05$) по відношенню до контролю зниженню вмісту ГК на 15 і 30-ту добу

спостереження (на 25-30 % у випадку ОЕФ-ЛП-502; на 13-21 % у випадку ОЕФ-ЛП-503). На 45-ту добу рівень ГК у печінці експериментальних тварин збільшувався ($p < 0,05$) у середньому на 21-28 %. Слід відзначити, що рівень ГК у печінці щурів за дії ОЕФ добре корелює з активністю УДФ-ГТ. Зниження рівня ГК відбувається на тлі підвищення активності ферменту, що може свідчити про активацію процесів за її участі. Навпаки, підвищення вмісту ГК спостерігається при зниженні активності ферменту, що може свідчити про пригнічення її використання у реакціях кон'югації.

При 15-ти добовій токсифікації щурів ОЕФ-ЛП-502 і ОЕФ-ЛП-503 у дозі 1/10 ЛД50 спостерігалось незначне, але вірогідне порівняно з контролем підвищення вмісту ЗГ (на 7-9 %) (див. табл.1). На 30 і 45-ту добу експерименту виявлено зниження вмісту показника, яке становило для ОЕФ-ЛП-502 відповідно 30 і 17 %, а для ОЕФ-ЛП-503 – 13 і 15 %. На 15-ту добу перорального введення щурам досліджуваних речовин у дозі 1/100 ЛД50 не виявлено статистично значимих ($p > 0,05$) при порівнянні з контролем змін вмісту ЗГ. На 30-ту добу дії ОЕФ у цій дозі визначалося вірогідне ($p < 0,05$) їх підвищення в середньому на 14-17 %, а на 45-ту добу, навпаки, зниження на 11-12 %. Виявлене зниження вмісту ЗГ у печінці щурів за дії ОЕФ відбувається на тлі підвищення ГК при інактивації УДФ-ГТ, що підтверджує гальмування цього шляху кон'югації.

Аналіз одержаних результатів свідчить про активацію глюкуронового шляху кон'югації у печінці щурів протягом перших 15-ти діб перорального введення досліджуваних ОЕФ у дозі 1/10 ЛД50 з подальшим його інгібуванням. У випадку введення щурам речовин у дозі 1/100 ЛД50 відбувається активація глюкуронової кон'югації протягом 30-ти діб (найбільш виражена протягом перших 15-ти діб) з наступним її зниженням. Доведено, що при різних формах печінкової недостатності можливим є зниження синтезу ГК та активності внаслідок цього глюкуронового шляху кон'югації, насамперед, по відношенню до ендогенних метаболітів [12]. Це, у свою чергу, викликає розбалансування метаболізму та посилення розвитку патологічного процесу. Попередніми дослідженнями [13] встановлено утворення кетонів і спиртів як продуктів біотрансформації досліджуваних ОЕФ, які до того ж мають здатність вступати в реакцію кон'югації з ГК. Виявлена наявність цих продуктів у сечі експериментальних тварин на 60-ту добу перорального введення ОЕФ свідчить про неможливість їх знешкодження у печінці щурів внаслідок ймовірного інгібування глюкуронового шляху кон'югації.

ВИСНОВКИ

1. У печінці щурів відбувається активація глюкуронового шляху кон'югації при 15-добовому пероральному введенні досліджуваних ОЕФ у дозі 1/10 ЛД50 з наступним його інгібуванням.

2. У випадку введення шурам речовин у дозі 1/100 ЛД₅₀ активація глюкуронової кон'югації спостерігається протягом 30-ти діб (найбільш виражено протягом перших 15 діб) з наступним її зниженням.

3. Порушення процесів кон'югації є однією з патогенетичних ланок механізмів дії ОЕФ-ЛП, що необхідно враховувати при розробленні засобів їх корекції.

Перспективи подальших досліджень. У подальшому планується продовжити комплекс досліджень, спрямованих на обґрунтування впливу речовин на організм теплокровних тварин з метою визначення їх потенційної небезпеки та нормування.

Література

1. Биохимические методы анализа показателей обмена биополимеров соединительной ткани. Методические рекомендации / Сост. П.Н. Шараев, В.Н. Пишков, О.Н. Зубарев [и др.]. – Ижевск. – 1990. – С. 9–10.

2. Жарин В. А. Полиморфизм генов биотрансформации ксенобиотиков / В.А. Жарин, С.В. Федорович, А.Г. Маркова // Военная медицина. – 2013. – № 3. – С. 122–124.

3. Жуков В.И. Медико-биологические аспекты проблемы охраны водных объектов от загрязнения поверхностно-активными веществами / В.И. Жуков, Р.И. Кратенко, Ю.К. Резуненко [и др.]. – Х. : Торнадо, 2000. – 394 с.

4. Крыжановский В.К. Технология полимерных материалов. Синтез. Модификация. Технологическое оформление. Рециклинг. Экологические аспекты / В.К. Крыжановский. – СПб. : Профессия, 2008. – 534 с.

5. Марченко М. М. Біохімічна трансформація ксенобіотиків у організмі / М. М. Марченко, О. В. Кеца, М. М. Великий. – Чернівці : Чернівецький нац. ун-т, 2011. – 280 с.

6. Покровский А.А. Методы разделения и ферментной идентификации субклеточных фракций / А.А. Покровский, А.И. Арчаков // Современные методы в биохимии. – М. : Медицина, 1968. – С. 5–59.

7. Столяр О.Б. Ксенобіотики: накопичення, детоксикація та виведення з живих організмів / О.Б. Столяр, І.В. Калініна, В.Г. Юкало. – Тернопіль : Видавництво ТНТУ ім. І. Пулюя, 2012. – 384 с.

8. Cummings J. Kinetic studies of latent microsomal UDP-glucuronyltransferases. Kinetics of glucuronidation in intact and perturbant-treated membranes / J. Cummings, A. B. Graham, G. C. Wood // Biochim. Biophys. Acta. – 1984. – Vol. 771, № 2. – P. 127–141.

9. Danielle K. Hepatocytes: the powerhouse of biotransformation / K. Danielle, O. Pelkonen, T. Ahokas // Int. J. Biochem. Cell Biol. – 2012. – Vol. 44. – P. 257–265.

10. Kamath S.A. A simple procedure for the isolation of rat liver microsomes / S.A. Kamath, F.A. Kummerow, K.A. Narayan // FEBS Lett. – 1971. – Vol. 17, № 1. – P. 90–92.

11. Monga S.P.S. Molecular pathology of liver diseases / S.P.S. Monga. – New York : Springer Publications, 2011. – 931 p.

12. Yuki H. A carbazole method for the differential analysis of glucuronate, glucosideuronate and hlycuronate / H. Yuki, N.H. Fischman // Biochem. et Biophys. – 1963. – Vol. 69. – № 3. – P. 576–578.

Активность глюкуронового пути конъюгации в печени крыс при действии олигоэфиров многоатомных спиртов. Бондарева А.В., Комаревцева И.А. – К числу распространенных в настоящее время факторов окружающей среды, которые способны проявлять негативное влияние на организм человека и животных, относятся чужеродные химические вещества, которые называют «ксенобиотики». Большинство ксенобиотиков при поступлении в организм не оказывают прямого биологического эффекта, так как подвергаются обезвреживанию. К числу неизученных в этом плане КБ относятся олигоэфиры многоатомных спиртов технического названия «Лапроли» (ОЭФ-ЛП), для которых характерны достаточно значительные объемы синтеза, широкое использование (как основы промышленного выпуска пластмасс, полиуретанов, лакокрасочных материалов, моющих средств, гидравлических и охлаждающих веществ и тому подобное), поступления к источникам питьевого водоснабжения населения и благодаря этому возможное влияние на здоровье человека.

В ходе исследования было установлено, что в печени крыс происходит активация глюкуронового пути конъюгации при 15-суточном пероральном введении исследуемых ОЭФ в дозе 1/10 ЛД50 с последующим его ингибированием. В случае введения крысам веществ в дозе 1/100 ЛД50 активация глюкуроновой конъюгации наблюдается в течение 30-ти суток с последующим ее снижением. Нарушение процессов конъюгации является одной из патогенетических звеньев механизмов действия ОЭФ-ЛП, что необходимо учитывать при разработке методов их коррекции. В дальнейшем планируется продолжить комплекс исследований, направленных на обоснование влияния веществ на организм теплокровных животных с целью определения их потенциальной опасности и нормирования.

Ключевые слова: ксенобиотики, глюкуроновый путь конъюгации, олигоэфиры многоатомных спиртов, УДФ-глюкуронилтрансфераза, глюкурониды.