

**II Школа токсикологов:
проблемы профессиональной и
экспериментальной
токсикологии**

**The II Toxicologists' School:
problems of professional and
experimental toxicology**

15-17 сентября 2010 года УкрНИИ МТ, Минздрав Украины, Украинское научное общество токсикологов, Комитет по вопросам гигиенического регламентирования в рамках Второго международного конгресса по медицине транспорта проводит симпозиум "Новые направления в токсикологических исследованиях. Вторая школа токсикологов". Продолжаем публикацию материалов симпозиума.

УДК 616

ВЛИЯНИЕ ФЕНАНТРЕНА НА НЕКОТОРЫЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ПОСТУПЛЕНИИ В ОРГАНИЗМ

**Ушков А.А., Позняк И.С., Половинкина Т.И., Ежелева С.Н.,
Петровская Е.О.**

ГУ «Республиканский научно-практический центр гигиены» г. Минск

Ключевые слова: фенантрен, полициклические ароматические углеводороды, биохимические исследования, метаболические процессы

Введение

Интерес к полициклическим ароматическим углеводородам (ПАУ) объясняется тем, что эти соединения являются основой для синтеза разнообразных промышленных химических агентов, биологически активных веществ, например, антибиотиков антрациклинового ряда и др. С другой стороны, ароматические углеводороды и их производные - это классические промышленные вещества, широко применяющиеся в самых разнообразных отраслях народного хозяйства, и в сфере контакта с ними находятся большие людские контингенты. К полициклическим ароматическим углеводородам обычно относятся соединения, содержащие более трех конденсированных ароматических колец, одним из которых является фенантрен. Большинство ПАУ не являются целевыми продуктами промышленности, а образуются при различных видах термической переработки органического сырья и в первую очередь - при сжигании почти всех видов твердо-

го и жидкого топлива. В результате этого загрязнение окружающей среды ПАУ носит убиквитарный характер.

Важно учитывать, что большинство ПАУ могут оказывать существенное негативное воздействие на организм. Следовательно, детальное рассмотрение проблем метаболизма ксенобиотиков, соотношения между истинной детоксикацией и образованием биологически активных метаболитов, вопросов субстратной индукции и ингибирования метаболизма, реакции конъюгации и пути выделения конъюгированных производных занимает особое место.

Подавляющее большинство ПАУ связано с образованием из них в процессе биотрансформации т.н. активных метаболитов, ковалентно связывающихся с регуляторными макромолекулами клетки ДНК, РНК и белка.

Основной путь биотрансформации ПАУ представляют система микросомальных ферментов печени, а также ме-

ханизмы реакций, катализируемых системой цитохром-Р-450-зависимых монооксигеназ. Необходимо отметить, что из всего набора реакций, катализируемых этими ферментами, в метаболизме ПАУ ведущую роль играют реакции гидроксилирования, которые приводят к образованию относительно полярных соединений, способных к дальнейшим превращениям и выведению из организма в виде конъюгатов. Образовавшиеся промежуточные продукты могут быть высокореакционноспособными электрофильными соединениями, которые будут неферментативно вступать в ковалентную связь с нуклеофильными центрами клетки. Такими центрами особенно богаты нуклеиновые кислоты, некоторые белки, а также восстановленные переносчики дыхательной цепи митохондрий. Таким образом, промежуточные продукты метаболизма ПАУ могут нарушать функционирование важнейших регуляторных и энергетических систем клетки. С этим связывают мутагенное, канцерогенное и эмбриотоксическое действие многих полициклическим ароматическим углеводородам.

Особое место в процессе истинной детоксикации ПАУ занимает образование конъюгатов с глутатионом, которые ацетилируются до производных меркаптуровой кислоты, затем подвергаясь дегидрированию, превращаются в меркаптуровую кислоту, которая выводится из организма с мочой.

Образование конъюгатов с глутатионом является процессом ферментативным и катализируется глутатион-8-трансферазой, которая является преимущественно цитоплазматическим ферментом, а также, что очень важно, играет основную роль в обезвреживании активных метаболитов ПАУ, если конъюгирование происходит в момент их образования.

Большинство ксенобиотиков обладают политропным характером действия на организм теплокровных животных. Следовательно, для гигиенического изучения оценки их биологического дей-

ствия применяется комплекс биохимических методов, характеризующих функциональное состояние различных органов и систем организма. При этом первостепенное внимание уделяется печени, как органу, занимающему центральное место в обмене веществ и в силу этого - в поддержании гомеостаза, а также как органу, в котором осуществляются важнейшие процессы детоксикации и эндогенных токсических метаболитов, и экзогенных для организма соединений. Состояние детоксикационной функции печени определяет особенности развития интоксикации, а также течение репаративных процессов. При оценке токсического действия фенантрена в хроническом эксперименте основное внимание уделялось изучению специфических сторон метаболизма печени, которые играют важную роль в обмене веществ, и адекватно отражают воздействие данного полициклического ароматического углеводорода на организм.

Материалы и методы

На основании литературных данных нами был выбран комплекс диагностически важных ферментов и метаболитов, которые участвуют в процессах детоксикации и имеют различную внутриклеточную локализацию: лактатдегидрогеназа [3] — цитоплазматическую; сукцинатдегидрогеназа [2] — митохондриальную; аминопиридиндеметилаза, анилингидроксилаза и оксидазы со смешанной функцией [1], обеспечивающие процессы конъюгации-микросомальную; остальные метаболиты характеризуют степень защиты гепатоцитов и процессы детоксикации при хроническом воздействии фенантрена. Оксидазы со смешанными функциями, катализирующие реакции биотрансформации ксенобиотиков, представляют собой полиферментный комплекс, локализованный на гладком эндоплазматическом ретикулуме и связанный с двумя немитохондриальными цепями переноса электронов.

SH-группы [5] своей высокой реакционной способностью и большим мно-

гообразия биохимических реакций в которые они вступают (процессы ацилирования, алкилирования, окисления, фосфорилирования и др.) обуславливают свое исключительное значение в образовании сложных трехмерных структур белков, что напрямую связано с ферментативным катализом, проницаемостью мембран и т.д., и в конечном счете функцией субклеточных структур и целостной клетки. Таким образом SH-группы несут важную функциональную нагрузку по защите каталитических центров энзимов.

Также нами были проведены исследования динамики развития окислительного стресса, которую оценивали по накоплению малонового диальдегида (МДА) [6] и карбонильным производным белков (КПБ), которые регистрировали по накоплению битирозина и флуоресценции остатков триптофана [7].

Значимое место в защите мембранных процессов занимают антиоксидантные механизмы, энзимной природы, одними из которых являются супероксиддисмутаза [4] и глутатионтрансфераза [8].

Результаты и их обсуждение

Использованные в работе биохимические методы исследования позволяют получить достаточно полное представление о действии фенантрена на метаболические процессы, происходящие в организме животных в хроническом эксперименте, результаты которых представлены в таблице.

В связи с тем, что фенантрен не растворим в воде, рабочие растворы готовили на 0,5 % твине, что определило необходимость ввести дополнительную группу экспериментальных животных и выяснить возможное действие растворителя на организм животного. Полученные результаты показали, что применяемый растворитель для фенантрена в хроническом эксперименте не влияет на метаболические процессы проходящие в организме, и биохимические показатели находятся на уровне контрольной группы.

При оценке действия фенантрена на микросомальное окисление, которое определялось по активности аминопириндемитазы и анилингидроксилазы

Таблица

Биохимические показатели сыворотки крови белых крыс при хроническом поступлении фенантрена

| Показатель | Результаты исследований | | | | |
|--|-------------------------|--------------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| | «Контроль чистый» | «Контроль твин-80» | Фенантрен 0,1 мг/кг | Фенантрен 1,0 мг/кг | Фенантрен 10,0 мг/кг |
| Аминопириндемитаза в микросомальной фракции печени (мк кат. форм/кг белка) | 14,9 ± 0,70 | 16,0 ± 0,40 | 16,8 ± 0,95 | 17,3 ± 1,13 | 18,2 ± 1,50* |
| Анилингидроксилаза в микросомальной фракции печени (нМ минопирина на кг белка) | 4,9 ± 0,31 | 5,4 ± 0,38 | 5,7 ± 0,32 | 6,0 ± 0,47 | 6,8 ± 0,47* |
| Сукцинатдегидрогеназа в гомогенате печени (мкг формазана на кг белка) | 18,0 ± 0,55 | 19,2 ± 0,35 | 17,0 ± 0,99 | 16,4 ± 0,74 | 16,0 ± 0,90 |
| Лактатдегидрогеназа в сыворотке крови (НАДФН на кг/белка) | 35,0 ± 2,88 | 40,5 ± 1,77 | 40,3 ± 2,60 | 40,7 ± 2,87 | 48,7 ± 4,10* |
| Супероксиддисмутаза в гомогенате печени | 197,3 ± 11,52 | 192,0 ± 10,24 | 203,9 ± 14,53 | 196,0 ± 12,0 | 204,7 ± 14,52 |
| SH-группы в цитозольной фракции печени (мкМ SH/г ткани) | 9,19 ± 1,84 | 8,72 ± 2,00 | 7,28 ± 0,51 | 8,0 ± 0,95 | 5,73 ± 0,43* |
| SH-группы в гемолизатах крови (мкМ SH/мл крови) | 73,27 ± 3,87 | 74,06 ± 4,71 | 75,6 ± 2,76 | 79,8 ± 3,33 | 71,4 ± 4,72 |
| Триптофан (усл. единицы) | 49,7 ± 3,80 | 47,6 ± 1,66 | 53,4 ± 5,44 | 43,4 ± 2,17 | 46,32 ± ,53 |
| Малоновый диальдегид (нмоль/мл) | 5,5 +1,31 | 5,08 + 1,38 | 6,14 +1,77 | 6,6 +1,00 | 6,8 + 1,26 |
| Битирозин (усл. единицы) | 22,4+ 1,80 | 29,4+2,84 | 21,41+ 1,25 | 21,3+1,18 | 25,6+ 1,73 |
| Глутатионтрансфераза (мкМ/мин/г белка) | 44,0 +2,0 | 44,05+ 3,27 | 51,3 +4,56 | 41,6 + 2,35 | 40,9 + 1,16 |

гомогенатов печени, было получено, что изменение активности этих монооксигеназ носит дозозависимый характер и, что величины активности ферментов, которые являются ключевыми в системе цитохром P₄₅₀-зависимых монооксигеназ, постепенно увеличиваются с возрастанием дозы вводимого препарата, а достоверный характер изменений достигается при введении фенантрена в дозе 10,0 мг/кг.

По всей вероятности это указывает на то, что фенантрен при длительном поступлении в организм катализирует реакции гидроксилирования, которые приводят к образованию реакционноспособных конъюгатов, активизирующих механизмы детоксикации с образованием малотоксичных соединений, затем выводятся из организма.

При изучении действия фенантрена в хроническом эксперименте особое внимание уделяли исследованию некоторых сторон липидного обмена по содержанию конечного метаболита - МДА и определению состояния антиоксидантной системы по содержанию в сыворотке крови и гомогенате печени SH-групп, а также исследованию активности супероксиддисмутазы и глутатионредуктазы, относящихся к экзистенциальным антиоксидантам, с учетом их важной роли в процессах защиты клетки.

Результаты, представленные в таблице, свидетельствуют о достоверном снижении уровня SH-групп в цитозольной фракции при воздействии фенантрена в дозе 10,0 мг/к.г. В то же время остальные антиоксидантные системы: ферментативные и неферментативные, отражающие уровень свободно-радикальных процессов - не претерпевают статистически значимых изменений по сравнению с контрольными данными.

Важное значение для оценки действия изучаемого ксенобиотика имеют процессы отражающие углеводный обмен, который оценивали по изменению активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ), и

энергетический статус митохондрий - по активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ). Биохимически установлено, что активность СДГ постепенно, хотя и не достоверно, снижается, что дает возможность предположить о напряжении происходящем в энергетической системе митохондрий. В то же время усиливаются процессы углеводного обмена проходящие в цитозоле клетки, на что указывает достоверное увеличение активности ЛДГ, при хроническом воздействии фенантрена в дозе 10,0 мг/кг. Хотя необходимо отметить об однотипном действии фенантрена при концентрации 0,1 и 1,0 мг/кг.

Окислительный стресс рассматривают в качестве одного из возможных механизмов проявления токсического действия полициклических ароматических углеводородов. Этот процесс можно охарактеризовать как нарушение равновесия между свободным образованием активных форм кислорода и активных антиоксидантных систем в сторону активации кислородных радикалов. Согласно данным, представленных в таблице, статистически значимое накопление конечных продуктов перекисного окисления липидов и карбонильных производных белков (триптофана и битириозина) не было отмечено при воздействии всех концентраций фенантрена в хроническом эксперименте, что говорит об отсутствии окислительного стресса, регистрируемого по накоплению продуктов окисления белков и липидов.

Выводы

В результате экспериментальных исследований установлено, что длительное хроническое воздействие фенантрена в течение года в дозе 10,0 мг/кг активизирует процессы микросомального окисления, что проявляется в увеличении активности аминопириндемитазы и анилингидроксилазы, лактатдегидрогеназы, а значит процессов углеводного обмена, и уменьшения содержания SH-групп, что может повлиять на проницаемость и кон-

формационный статус мембранных структур.

Следовательно, защита клетки по косвенным биохимическим показателям становится не очень устойчивой системой и при воздействии больших концентраций фенантрена в последствии может привести к нарушению нормального функционированию клетки.

Литература

1. Карузина А. И., Арчакова А. И. Современные методы в биохимии. М., Медицина, 1977, 49-69.
2. Яковлев Н. И., Александрова Г. В., Батупер Л. С. Физиолог. Журнал, СССР-1978, N11, 1655-1666.
3. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии.-М.: Высшая школа, 1971, с. 352-353.
4. В. А. Костюк, А. И. Потапович, Ж. В. Ковалева. Вопросы мед. Химии, 1990, N3, т. 36, 87-91.
5. А.И. Карпищенко, С.И.Глушенко, В.В. Смирнов. Токсикологический вестник, №3, 1997, с.17-22.
6. М.С. Гончаренко, А. М. Латипова Лаб. Дело 1985, 1, 60-63.
7. Kelvin J. A. Davies. Protein Damage and Degradation by Oxygen Radicals 1. General aspects. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 262, № 20, pp 9895-9901, 1987.
8. А.И. Карпищенко, С.И.Глушенко, В.В. Смирнов. Токсикологический вестник, №3, 1997, с.17-22.

Резюме

ВПЛИВ ФЕНАНТРЕНУ НА ДЕЯКІ МЕТАБОЛІЧНІ ПРОЦЕСИ ПРИ ТРИВАЛОМУ НАДХОДЖЕННІ В ОРГАНІЗМ

*Ушков А.А., Позняк І.С.,
Половінкіна Т.І., Ежельова С.Н.,
Петровська Е.О.*

В результаті експериментальних досліджень встановлено, що тривала хронічна дія фенатрена протягом року в

дозі 10,0 міліграм/кг активізує процеси микросомального окислення, що виявляється в збільшенні активності амінопіриндемیتеллази і анілінгідроксилази, лактатдегідрогенази, тобто процесів вуглеводного обміну, і зменшує вміст SH-груп, що може вплинути на проникність і конформаційний статус мембранних структур, тобто дія великих концентрацій фенантрена може привести до порушення нормального функціонування клітини.

Ключові слова: фенантрен, поліциклічні ароматичні вуглеводні, біохімічні дослідження, метаболічні процеси

Summary

INFLUENCE OF PHENANTHRENE ON SOME METABOLIC PROCESSES AT A LONG-TERM RECEIPT TO AN ORGANISM
*Ushkov A.A., Poznjak I.S., Polovinkina T.I.,
Ezheleva S.N., Petrovskaya E.O.*

As a result of experimental researches it is established, that long chronic influence of phenanthrene within a year in a dose of 10,0 mg/kg makes active processes of microsomal oxidation that is shown in activity increase aminopyrindemitelase, aniline hydroxylase and lactate dehydrogenase so processes of a carbohydrate exchange, and reduction of the content of SH-groups that can influence permeability and the conformational status of membrane structures, i.e. influence of the big concentration of phenanthrene can lead to infringement normal to cage functioning.

Keywords: phenanthrene, polycyclic aromatic hydrocarbons, biochemical researches, metabolic processeses

*Впервые поступила в редакцию 16.06.2010 г.
Рекомендована к печати на заседании редакционной коллегии после рецензирования*