

А.И. Котеленец, А.Г. Давыдовский, В.Г. Цыганков.*

ХАРАКТЕРИСТИКА ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАТНОГО БАЛАНСА БИОСИСТЕМ РАЗЛИЧНОЙ СЛОЖНОСТИ В ОЦЕНКЕ ТОКСИЧНОСТИ ПРОМЫШЛЕННЫХ ОТХОДОВ

Большинство промышленных отходов (ПО) металлообработки, металлургических, химических, пищевых и ряда других производств характеризуются сложным химическим составом, включая кислые отходы, полихлорированные дифенилы и их аналоги (диоксины), минеральные масла, органические растворители, цианид-содержащие соединения, соединения тяжелых металлов ртути, меди, цинка, никеля, свинца, кадмия, хрома, железа, алюминия, а также фармацевтические отходы, бактерицидные и биоцидные средства, асбестосодержащие материалы, отходы пластмасс (полимеры и мономеры), фенолы, крезолы и их производные. Однако точное содержание и соотношение компонентов ПО во многих случаях неизвестно, что делает трудно прогнозируемыми биологические последствия поступления ПО в биосистемы различной сложности. Указанные соединения могут демонстрировать значительные цитотоксические, мутагенные, мембранотропные, канцерогенные и тератогенные свойства различной степени выраженности и представляют серьезную экологическую опасность. Поступление ПО в биосистемы различной сложности сопровождается снижением их жизнеспособности и нарушениями функциональных и адаптационных механизмов. На клеточном уровне действие ПО сопровождается образованием гигантских и деформированных митохондрий [1], микроядер и фрагментацией ДНК [2], нарушениями пролиферации и дифференцировки клеток, провокацией малигнизации, апоптоза и некроза. Эти эффекты ПО могут быть исследованы с помощью методов световой, люминесцентной и электронной микроскопии (СЛЭМ). Многие ПО способны модифицировать структурно-функциональные свойства биомакромолекул (ДНК, белков, нуклеопротеидов в составе ядерного хроматина), цитоплазматических мембран, белковых компонентов систем внутриклеточной трансдукции регуляторных сигналов, митохондрий, ядра целых клеток и их субпопуляций, тканей, органов, целостных организмов. Хроническое поступление ПО в биогеоценозы вызывает нарушения функциональных взаимосвязей между их компонентами, инициирует их прогрессирующую деградацию [2]. Многие ПО обладают свойствами пролифераторов пероксисом и активируют процессы свободно-радикального перекисного окисления липидов (ПОЛ) и окислительной модификации белков (ОМБ), вызывают дисфункцию антиоксидантной системы (АОС) в клетках печени, почек, кишечника, головного мозга, лимфоидных органов млекопитающих [2, 3].

*ГНУ "Институт физиологии" НАН Беларуси, г. Минск.

Наиболее информативными для целей оценки токсичности ПО являются биоиндикационные исследования [2] с использованием тестовых биосистем различной сложности: бактерий (*Salmonella typhimurium*, бактерий других видов и штаммов), простейших (инфузорий), водорослей (цианей, спирулин), нормальных (гепатоцитов, лимфоцитов, эпителиоцитов) и трансформированных эукариотических клеток животных и человека, а также беспозвоночных (планарии, дафнии, циклопы, насекомые), низших (рыбы, амфибии – лягушки, тритоны, аксолотли) и высших (млекопитающие-грызуны: мыши, крысы, хомячки) животных [2 – 6].

Доступными и широко распространенными методами для оценки токсичности и мутагенной активности ПО являются:

(а) оценка мутагенной активности в тесте Эймса (МАТЭ), для которого удобными тест-системами является минимальный набор штаммов, штаммы *Salmonella typhimurium* TA 97, TA 98 и TA 100; а также

(б) оценка интенсивности образования микроядер в эукариотических клетках в микроядерном тесте (МТ) с использованием первичных и перививаемых культур нормальных и трансформированных клеток печени, красного костного мозга, тимуса, селезенки и периферической крови экспериментальных животных, а также лимфоцитов периферической крови и клеток биопробатов органов человека (рисунок) [4 – 6].

Важнейшую роль в развитии и реализации токсических и мутагенных эффектов ксенобиотиков играют активные формы кислорода (АФК) и продукты свободно-радикального ПОЛ, которые активируют факторы регуляции генойной транскрипции, такие как AP-1, AP-2, AP-4, NF- κ B, тус/тах, металл-чувствительные и индуцируемые под влиянием теплового шока (HSEs), ССААТ-энхансер-связывающий белок (С/ЕВР), контролирующие экспрессию провоспалительных цитокинов, ферментов метаболизма ксенобиотиков, внутриклеточной АОС, регулирующих прооксидантно-антиоксидантный баланс биосистем различной сложности. Состояние физико-химической системы “свободно-радикальные процессы-антиоксидантная активность” (“СРП-АОА”) детерминирует особенности структурно-функциональной организации биосистем различной сложности, в частности, цитоплазматических мембран, систем внутриклеточной сигнальной трансдукции, электротранспортных систем, образование и интернализацию лиганд-рецепторных комплексов, регуляцию клеточного цикла, инициацию малигнизации, апоптоза или некроза [7] эукариотических клеток под влиянием ПО и/или их реакционноспособных метаболитов, образующихся в системе ферментов метаболизма ксенобиотиков.

При этом существенную роль в инициации токсических, мембранотропных, мутагенных и канцерогенных эффектов играют процессы свободно-радикального окисления, такие как свободно-радикальные ПОЛ и ОМБ, а также механизмы антиоксидательной активности (АОА) по липидному и белковому компонентам мембран и общей, АОА (по липидам), АОА (по белкам) и АОА(общая), соответственно. Продукты свободно-радикального ПОЛ (гидроперекиси липидов, шиффовы основания, альдегиды, эпоксиды, кето-

ны, изопростаны, изолейкотриены) химически модифицируют ДНК, липидный и белковый компоненты цитоплазматических мембран, цитоскелет, системы внутриклеточной сигнальной трансдукции, инициируют одно- и двухнитевые разрывы ДНК и РНК, образование сшивок “ДНК-ДНК”, “ДНК-белок”, “белок-белок”. Усиление процессов свободно-радикального ПОЛ в клетке снижает гидрофобность мембранных липидов, затрудняя их латеральную диффузию и “flip-flop”-переходы в цитоплазматической мембране, для которой в этом случае характерна повышенная ригидность. Развитие свободно-радикального ПОЛ приводит к окислительной модификации интегральных белков, входящих в состав молекулярных систем, осуществляющих активный транспорт ионов и низкомолекулярных соединений (гормонов, продуктов ПОЛ и ОМБ, вторичных посредников, ксенобиотиков, а также ряда ПО). Причем продукты свободно-радикального ПОЛ способны выполнять функции межклеточных и внутриклеточных мессенджеров в клетках многих тканей, для которых характерна повышенная интенсивность процессов свободно-радикального окисления [8].

По нашему мнению, вызывая окислительную модификацию ДНК-полимераз, эндонуклеаз, поли-(АДФ)-рибозилполимераз, репарирующих потенциальные первичные повреждения (ППП) биомакромолекул (ДНК, РНК, белков), тем самым продукты свободно-радикального ПОЛ могут инициировать развитие последовательности молекулярных, клеточных, тканевых и системных событий в такой последовательности: ППП → повреждение механизмов регуляции экспрессии генов, модификации факторов регуляции геной транскрипции → угнетение процессов биосинтеза белков и липидов, нарушения функций цитоскелета, индукция канцерогенеза, → фрагментация ядра, апоптоза, некроза → включение механизмов запрограммированной гибели клеточных субпопуляций, тканей, органов → дисбаланс нейроиммуноэндокринных взаимосвязей, нарушение деятельности физиологических систем → включение механизмов запрограммированной гибели организма (феноптоза).

Критически важными для оценки и прогнозирования жизнеспособности и функционально-метаболического состояния биосистем различной сложности в условиях действия ПО могут быть функционально-метаболические индексы (ФМИ):

(1) $ФМИ_1 = [M - K] / [100 - K] \times 100\%$, количественно характеризующий интенсивность образования микроядер, где M и K – частоты, соответственно, спонтанного и ПО-индуцированного образования микроядер;

(2) $ФМИ_2 = [МАТЭ(p) - МАТЭ(k)] / МАТЭ(p) \times 100\%$, где МАТЭ(p) и МАТЭ(k) – количество ревертантов при действии КПО и в контроле, соответственно;

(3) $ФМИ_3 = [ДНК(общ.) - ДНК(фрагм.)] / ДНК(общ.) \times 100\%$, где ДНК(фрагм.) – количество общей и фрагментированной ДНК, соответственно, в биоиндикационной системе (клетки, ткани, организмы, популяции).

На основании анализа литературы и собственных экспериментальных наблюдений нами предлагаются следующие формулы, которые могут быть

применимы для качественно-количественной оценки токсичности ПО (ТПО) в биосистемах различной сложности:

(4) $ТПО = \xi[ФМИ_1 + ФМИ_2 + ФМИ_3]$, где ξ – интегральный критерий прооксидантно-антиоксидантного баланса биосистемы любого уровня сложности (от субклеточно-мембранного до популяционно-видового) при действии трех концентраций (доз) ПО (c_1, c_2 и c_3 , причем $c_1 = 0,2 c_2$ или $0,1 c_2$, а $c_3 = 5c_2$ или $10c_2$) и который рассчитывается по формуле:

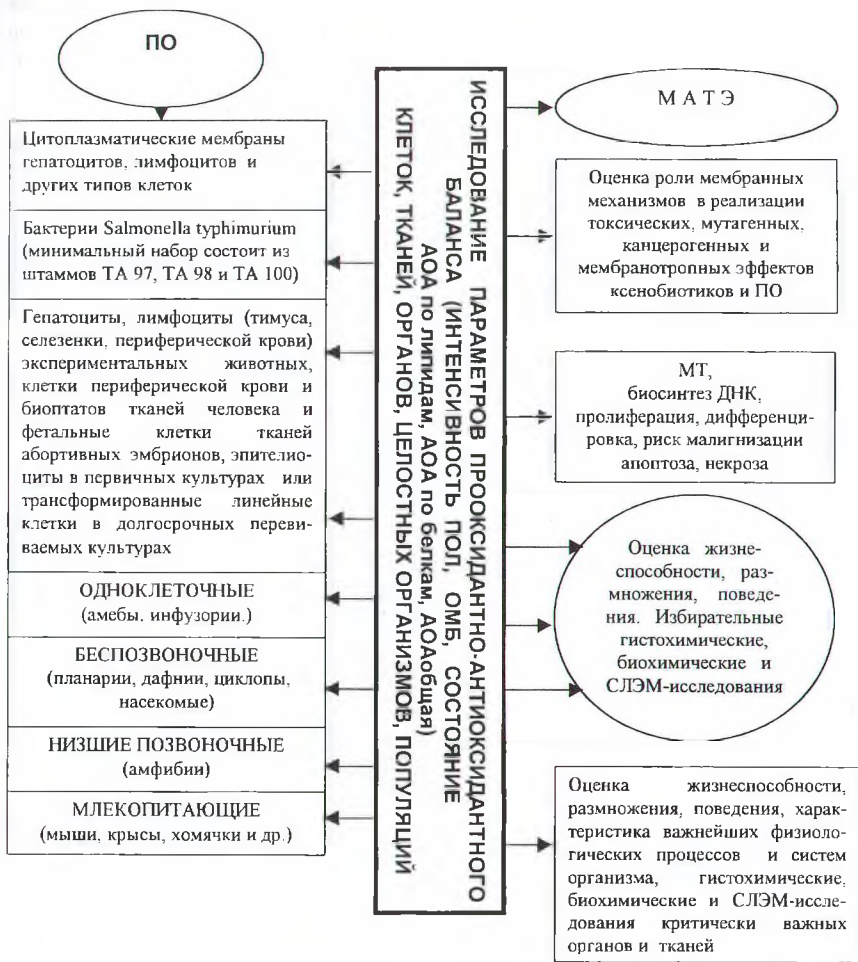


Рис. Роль исследования параметров прооксидантно-антиоксидантного баланса в биосистемах различной сложности при оценке токсичности промышленных отходов различного происхождения.

(5) $\xi = [\varphi_{(ПОЛ)} + \varphi_{(ОМБ)} + \varphi_{(ПОЛхОМБ)}] / [\varphi_{(АОА по липидам)} + \varphi_{(АОА по белкам)} + \varphi_{(АОАобщая)}]$.
 При этом

(6) $\varphi_{ПОЛ} = 1/3 \{ \ln[ПОЛ(c_1)/ПОЛ(c_0)] / (c_1 - c_0) + \ln[(ПОЛc_2/ПОЛc_1)] / (c_2 - c_1) + \ln[(ПОЛc_3/ПОЛc_2)] / (c_3 - c_2) \}$.

Аналогично производятся расчеты $\varphi_{(ОМБ)}$, $\varphi_{(ПОЛхОМБ)}$, $\varphi_{(АОА по липидам)}$ и $\varphi_{(АОА по белкам)}$.

Причем, если величина ТПО < 0, это свидетельствует о преимущественной роли механизмов АОА в развитии токсических и мутагенных эффектов ПО; если ТПО > 0, то вероятно, что в реализации повреждающих эффектов ПО участвуют, главным образом, активные формы кислорода, интермедиаты и конечные продукты свободно-радикальных процессов ПОЛ и ОМБ. Случай, когда ТПО = 0 или $\rightarrow 0$, наиболее вероятен для реализации токсических и мутагенных эффектов ПО без участия механизмов физико-химической системы “СРП-АОА”.

С учетом важной роли механизмов физико-химической системы “СРП-АОА” в реализации токсических, мембранотропных, мутагенных и канцерогенных эффектов ПО, при оценке токсичности ПО в тестовых биосистемах различной сложности (рисунк) представляется целесообразным применение методов исследования таких параметров прооксидантно-антиоксидантного баланса, как:

- 1) интенсивность свободно-радикального ПОЛ,
- 2) интенсивность свободно-радикальной ОМБ,
- 3) АОА(по липидам),
- 4) АОА(по белкам),
- 5) АОА(общая).

Характеристика параметров физико-химической системы “СРП-АОА” может послужить основой для разработки новых, дополнительных к традиционным методам (МАТЭ, МТ, физиологические, гистохимические, биохимические и СЛЭМ-исследования) методов и критериев качественно-количественной оценки токсичности и мутагенной активности ПО различного происхождения. Кроме того, результаты исследований и данные их качественно-количественного анализа с помощью недетерминистских математических моделей и предлагаемых формул (1) – (6) могут быть использованы при создании компьютерных экспертных систем и электронных баз данных для оценки и прогнозирования динамики и отдаленных последствий токсических, мембранотропных, мутагенных, канцерогенных эффектов ПО, поступающих в современные урбозкосистемы, насыщенные экологически опасными технологическими процессами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Benedeczy I.I., Nemcsok J. // Pathol. Oncol. Res. – 1997. – Vol. 3, N 3. – P. 20-25.
2. Орлов Д.С., Садовникова Л.К., Лозановская И.Н. Экология и охрана биосферы при химическом загрязнении. – М., Высшая школа. – 2002. – 334 с.
3. Nebert D.W. // Clin. Chem. Lab. Med. – 2000. – Vol. 38, N 9. – P. 857-861.

4. Maron D.M., Ames B.N. // *Mutat. Res.* – 1983. – Vol. 113, NN 3-4. – P.173-215.
5. Wolf T., Niehaus-Rolf C., et al. // *Mutat. Res.* – 2002. – Vol.514,NN1-2.–P. 59-76.
6. Красовский Г.Н., Егорова Н.А. // *Гигиена и санитария.* - 2000. – N 2. –С. 63 – 66.
7. Camhi S.L, Lee P., et al. // *New Horizons.* – 1995. – Vol. 3, N2. – P.170 – 182.
8. Bauer V., Bauer F. // *Gen. Physiol. Biophys.* – 1999. – Spec. No. – P. 7-14.

УДК 543:632.95+613.169.16]: 636.085].087

*А.И. Котеленец, И.И. Ильюкова, С.Ю. Петрова,
В.А. Степанищева, А.А. Ушко*

ИЗМЕНЕНИЯ В ТИРЕОИДНОЙ СИСТЕМЕ БЕЛЫХ КРЫС В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НИТРАТА НАТРИЯ И НИЗКОДОЗОВОГО ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Щитовидная железа явилась одним из наиболее пораженных в результате аварии на ЧАЭС органов. На сегодняшний день имеет место избыточная заболеваемость болезнями щитовидной железы, сохраняющийся у них повышенный риск узловых форм зоба и тиреоидитов, впервые на территории Беларуси появился радиационно-индуцированный тиреоидный рак.

Длительное поступление повышенного количества нитратов в организм приводит к усилению отрицательного воздействия йодного голодания, в результате чего складываются благоприятные условия для развития зоба.

Ввиду того, что щитовидная железа является одним из наиболее уязвимых органов при сочетанном действии неблагоприятных факторов окружающей среды, мы пришли к выводу о необходимости изучения ее морфофункциональных особенностей в условиях сочетанного действия радиоцезия и нитрата натрия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования явились нелинейные крысы-самцы в половозрелом возрасте, подвергшиеся разделному и сочетанному воздействию ионизирующего излучения (ИИ) и нитрата натрия. Для создания модели интракорпорального воздействия ионизирующего излучения использовали 30-кратное внутривентрикулярное введение Cs-137, суммарное суточное поступление которого составляло 370 Бк/крысу. Нитрат натрия вводили внутривентрикулярно в дозах 1500 мг/кг, 500 мг/кг, 250 мг/кг и 150 мг/кг массы животного в пересчете на нитрат –ион.

Функциональное состояние щитовидной железы тестировали по уровням тироксина (T_4) и трийодтиронина (T_3), содержание которых определяли в сыворотке крови белых крыс *in vitro* методом радиоиммунного анализа.

По окончании эксперимента кусочки щитовидной железы извлекались и фиксировались в 10% нейтральном формалине. Материал заливался в парафин обычным способом после проводки по спиртам восходящей крепос-