

Л.М. Палиця, М.М. Корда, А.Є. Мудра, Л.Я. Федонюк
 ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет
 ім. І. Я. Горбачевського МОЗ України», Тернопіль

ФУЛЕРЕНИ C₆₀ ПОСИЛЮЮТЬ ТОКСИЧНИЙ ЕФЕКТ ТОЛУОЛУ НА СТАН ФЕРМЕНТАТИВНОЇ СИСТЕМИ БІОТРАНСФОРМАЦІЇ КСЕНОБІОТИКІВ

E-mail: palicalm@tdmu.edu.ua

Розвиток нанотехнологій сприяє появі нових ультрависокодисперсних форм речовин – наноматеріалів, вплив яких на здоров'я людини може бути непередбачуваним. Метою даної роботи було дослідити ефект комбінації фулеренів C₆₀ з відомим хімічним токсикантом толуолом на активність ферментів першої та другої фази метаболізму ксенобіотиків в печінці щурів. Тваринам інтраперитонеально вводили суспензію фулеренів (60 мг/кг), толуол (0,5 мл/кг) і толуол з розчиненими в ньому фулеренами. В динаміці (3-72 год) в мікросомах печінки визначали активність УДФ – глюкуроніл-трансферази, етоксирезорифін-О-деетилази (ЕРОД), глутатіонтрансферази. Максимальні зміни всіх показників у всі терміни дослідження зареєстровано у IV групі тварин, яким вводили фулерени, розчинені в токсиканті толуолі. В цьому випадку активність ЕРОД та УДФ – глюкуронілтрансферази достовірно зростала, а активність глутатіонтрансферази достовірно знижувалась порівняно з тваринами, яким вводили тільки толуол. Зроблено висновок, що карбонові наночастинки фулерени C₆₀ здатні потенціювати токсичний вплив хімічного токсиканта толуолу на систему біотрансформації ксенобіотиків.

Ключові слова: фулерени, толуол, ферменти біотрансформації ксенобіотиків.

Робота є фрагментом науково-дослідної роботи «Біохімічні механізми порушень метаболізму за умов надходження до організму токсикантів різного генезу», № державної реєстрації 0116U003353.

На сьогоднішній день серед напрямків науково-практичної діяльності людини особливе місце займають нанотехнології. Термін «нанотехнологія» стосується матеріалів розмірами від 1 до 100 нм [1, 4, 8]. За своїми розмірами наночастинки займають проміжне положення між окремими молекулами та мікротілами.

Серед усіх наноматеріалів карбонові наночастинки, зокрема, фулерени C₆₀, зважаючи на їх специфічні фізико-хімічні властивості (малий розмір, форму, хімічний склад, заряд, структуру), мають чи не найбільший потенціал і перспективу використання у різних сферах виробництва, побуті і медицині [2, 11, 13, 6]. При цьому в більшості випадків фулерени C₆₀ можуть впливати на організм людини не ізольовано, а в поєднанні з великим числом різних речовин хімічної природи, які є забруднювачами навколишнього середовища. Це становить особливу небезпеку, оскільки існує вірогідність посилення токсичних ефектів хімічних речовин під дією карбонових наночастинок, що пов'язано з можливістю адсорбції традиційних токсикантів на наночастинках і, як результат, полегшенням їх транспорту в клітини організму. Тому постає питання про необхідність фундаментального розуміння токсикологічних властивостей наночастинок при їх попаданні в організм разом з «класичними» хімічними токсикантами.

Метою роботи було оцінити інтегральний вплив фулеренів C₆₀ і хімічного токсиканта толуолу на активність ферментів першої та другої фази метаболізму ксенобіотиків в печінці щурів.

Матеріал та методи дослідження. Досліди виконані на 104 безпородних щурах-самцях масою 150-180 г, яких утримували на стандартній дієті. Всіх тварин поділили на 4 групи: I-а – контрольна (інтактні щури), яким інтраперитонеально вводили фізрозчин (0,5 мл/кг); II-а – щури, яким інтраперитонеально вводили 60 мг/кг колоїдного розчину фулерену C₆₀. Диспергування наночастинок C₆₀ у фізіологічному розчині проводили за допомогою ультразвукового диспергатора УЗДН-М750Т (25 кГц, 750 Вт) протягом 5 хв; III-а – тварини, яким інтраперитонеально вводили толуол в дозі 0,5 мл/кг; IV-а – щури, яким вводили фулерен (60 мг/кг), розведений в толуолі (0,5 мл/кг). Тварин виводили з експерименту під тіопенталовим наркозом через 3, 6, 24 і 72 год після чого виділяли субклітинні фракції печінки.

Утримання тварин та експерименти проводились у відповідності до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях».

Мікросоми гепатоцитів одержували шляхом їх преципітації з йонами кальцію в 80 мМ CaCl₂ в 10 мМ Tris-HCl буфері, рН 7,4. В мікросомах визначали активність етоксирезорифін О-деетилази (ЕРОД) при 572 нм за утворенням резорифину [10]. Реакцію ініціювали додаванням 0,5 мМ NADPH. Активність ЕРОД обчислювали, використовуючи молярний коефіцієнт екстинкції 73,2 мМ⁻¹см⁻¹, і перераховували на вміст мікросомального протеїну [14]. Визначення УДФ-глюкуронілтрансферази (УДФ-ГТ) в мікросомах проводили методом імуноферментного аналізу (ІФА) з використанням

комерційних наборів "Elabscience" (Китай). Абсорбцію проб вимірювали на апараті "StatFax 303 Plus" відповідно до протоколу виробника. В постмітохондріальній фракції визначали активність глутатіонтрансферази (GST) спектрофотометрично за утворенням адуктів 1-хлоро-2,4-динітробензолу з глутатіоном [12].

Статистичну обробку результатів виконували у відділі статистичних досліджень Тернопільського державного медичного університету ім. І. Я. Горбачевського з використанням статистичних прикладних програм Microsoft Excel 2007 і Statsoft STATISTICA. Результати виражали як середнє \pm SEM з 8 експериментів. Порівнювали отримані величини з використанням непараметричного критерію Манна-Уїтні. Зміни вважали статистично достовірними при $p < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення. В умовах різноманітних хімічних впливів на живий організм в процесі еволюції виробилися системи біотрансформації ксенобіотиків, що забезпечують зберігання та підтримання гомеостазу. Особлива увага приділяється системі біотрансформації ліпофільних ксенобіотиків, яка складається з двох функціонально пов'язаних фаз. Перша фаза представляє собою ензиматичну біотрансформацію ліпофільних ксенобіотиків за участю цитохром Р450-залежних монооксигеназ, друга - кон'югацію реактивних метаболітів і гідрофільних сполук. Порушення узгодженого процесу функціонування обох фаз є одним з механізмів, що призводять до зміни гомеостазу і розвитку патологічних процесів. В більшості випадків метаболічні перетворення ксенобіотиків ведуть до прискорення їх елімінації та зменшення біологічної активності [9, 3]. Однак, нерідко в процесі метаболізму сторонніх речовин утворюються реакційноздатні інтермедіати та активні форми кисню, які ковалентно зв'язуються з клітинними макромолекулами, компонентами мембран, ініціюють оксидативний стрес [7].

За умов введення щурам чистої суспензії фулеренів C_{60} у дозі 60 мг/кг показники біотрансформації ксенобіотиків достовірно не змінювалися порівняно з аналогічними показниками у інтактних тварин у всі терміни дослідження (табл. 1).

Таблиця 1

Вплив фулеренів C_{60} на активність ферментів метаболізму ксенобіотиків в печінці щурів
($M \pm m, n = 8$)

Показник	Групи тварин				
	Інтактні	C_{60}			
		Час після введення (год)			
		3	6	24	72
ЕРОД, $\mu\text{моль хв}^{-1} \text{мг}^{-1}$ білка	2,45 \pm 0,14	2,20 \pm 0,16	2,42 \pm 0,15	2,58 \pm 0,12	2,60 \pm 0,16
Глутатіон-трансфераза, $\text{нмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка	7,88 \pm 0,40	8,10 \pm 0,37	7,95 \pm 0,35	8,03 \pm 0,28	7,76 \pm 0,42
УДФ- глюкуроніл-трансфераза $\text{нмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка	5,05 \pm 0,32	5,20 \pm 0,29	5,35 \pm 0,26	5,12 \pm 0,24	5,38 \pm 0,30

На відміну від фулеренів, інтраперитонеальне введення тваринам толуолу у дозі 0,5 мл/кг призводило до різкого підвищення в мікросомній фракції печінки активності ЕРОД (в 1,9 рази) та УДФ-глюкуронілтрансферази (в 1,8 рази) вже через 3 год після застосування токсиканта. Активність ще одного ферменту глутатіонтрансферази, який належить до ензимів II фази детоксикації ксенобіотиків та бере участь в знешкодженні токсичних речовин різних хімічних класів, зокрема поліароматичних вуглеводнів, а також включається у захист тканин від наслідків «кисневого вибуху» та роботи пероксидаз, інактивуючи вторинні метаболіти оксидативного стресу, зменшувалася достовірно порівняно з контролем через 3 і 6 год після введення токсину (відповідно в 1,3 та 1,2 рази) (табл. 2).

Таблиця 2

Вплив толуолу на активність ферментів метаболізму ксенобіотиків в печінці щурів ($M \pm m, n = 8$)

Показник	Групи тварин				
	Інтактні	Толуол			
		Час після введення (год)			
		3	6	24	72
ЕРОД, $\mu\text{моль хв}^{-1} \text{мг}^{-1}$ білка	2,45 \pm 0,14	4,75 \pm 0,24*	4,43 \pm 0,26*	3,67 \pm 0,19*	2,80 \pm 0,17
Глутатіон-трансфераза, $\text{нмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка	7,88 \pm 0,40	5,83 \pm 0,30*	6,35 \pm 0,27*	7,02 \pm 0,32	7,29 \pm 0,38
УДФ- глюкуроніл-трансфераза $\text{нмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка	5,05 \pm 0,32	9,20 \pm 0,57*	8,58 \pm 0,49*	6,96 \pm 0,35*	5,73 \pm 0,44

Примітка. * - зміни достовірні порівняно з контролем ($p < 0,05$).

Максимальні зміни показників функціонування активності ферментативної системи біотрансформації ксенобіотиків зафіксовано у тварин, яким вводили толуол разом з карбоновими

наночастинками. Як видно з даних таблиці 3, в тварин IV групи, через 3 год після початку експерименту активність ЕРОД та УДФ-глюкуронілтрансферази зростала в 2,4 та 2,1 раза порівняно з інтактними щурами. При цьому на 3, 6 і 24 год дослідження активність ЕРОД та УДФ-глюкуронілтрансферази у тварин IV групи була достовірно вищою порівняно з групою тварин, яким вводили тільки хімічний токсикант.

Таблиця 3

Вплив поєднаного застосування C_{60} і толуолу на активність ферментів метаболізму ксенобіотиків в печінці щурів ($M \pm m, n = 8$)

Показник	Групи тварин				
	Інтактні	Толуол + C_{60}			
		Час після введення (год)			
		3	6	24	72
ЕРОД, пмоль $xv^{-1} \text{ мг}^{-1}$ білка	2,45 \pm 0,14	5,88 \pm 0,30*#	5,56 \pm 0,28*#	4,50 \pm 0,20*#	3,47 \pm 0,18*
Глутатіон-трансфераза, нмоль $\cdot xv^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка	7,88 \pm 0,40	4,70 \pm 0,25*#	5,15 \pm 0,24*#	6,00 \pm 0,17*#	6,64 \pm 0,15*
УДФ-глюкуроніл-трансфераза I A I нмоль $\cdot xv^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка	5,05 \pm 0,32	10,82 \pm 0,48*#	10,37 \pm 0,41*#	8,63 \pm 0,45*#	6,58 \pm 0,36*

Примітка. * - зміни достовірні порівняно з контролем ($p < 0,05$); # - зміни достовірні порівняно з групою тварин, яким вводили толуол ($p < 0,05$).

Активність ферменту глутатіонтрансферази в печінці щурів IV групи суттєво пригнічувалася у всі терміни експерименту. Відомо, що глутатіонтрансфераза є важливим компонентом антиоксидантного захисту. Тому зафіксоване нами зменшення активності даного ферменту в значно більшому ступені в щурів, яким вводили толуол разом з карбоновими наночастинками фулеренами, у порівнянні з тваринами, які піддавалися впливу тільки толуолу, підтверджують наші попередні дослідження, щодо глибокого порушення функціонування антиоксидантної системи при поєднаній дії на організм наночастинок і ксенобіотика [5].

Отже, аналіз одержаних результатів свідчить про виражені функціональні зміни ферментних систем I та II фази детоксикації ксенобіотиків при попаданні в організм хімічного токсиканта толуолу разом з карбоновими наночастинками фулеренами C_{60} . Такий синергізм токсичних ефектів досліджуваних чинників найбільш ймовірно зумовлений здатністю фулеренів абсорбувати на своїй поверхні велику кількість токсину і сприяти його транспорту до тканин і клітин, зокрема, в гепатоцити. Можливо також, що фулерени безпосередньо змінюють метаболічні шляхи в клітинах, призводячи до токсифікації ксенобіотиків хімічної природи.

Висновок

Карбонові наночастинки фулерени C_{60} потенціюють токсичний вплив хімічного токсиканта толуолу на систему біотрансформації ксенобіотиків.

Список літератури

- Balabanov VI. Nanotekhnologii. Nauka budushchego. Moskva: Eksmo; 2009. 220 c. [in Russian]
- Gmshinskiy IV, Smirnova VV, Khotimchenko SA. Sovremennoye sostoyaniye problemy otsenki bezopasnosti nanomaterialov Rossiyskiye nanotekhnologii. 2010. 5(10): 6–10. [in Russian]
- Zharin VA, Fedorovich SV, Markova AG. Polimorfizm genov biotransformatsii ksenobiotikov. Voyennaya meditsina. 2013. 3: 122-124. [in Russian]
- Lakhtin VM, Afanas'yev SS, Lakhtin MV. Nanotekhnologii i perspektivy ikh ispolzovaniya v meditsine i biotekhnologii. Vestnik RAMN. 2008. 4: 50-55. [in Russian]
- Palytsya LM, Korda MM. Karbonovi nanochastynky pidsylyuyut vyklykany toluolom oksydatyvnyi ta nitrooksydatyvnyi stres. Visnyk problem biolohiyi i medytsyny. 2017; 2(136): 308 – 311. [in Ukrainian]
- Palytsya LM, Yastremska SO, Korda MM. Toksychnist fulereniv: otsinka ryzyku yikh vplyvu na zdorovya lyudey. Medychna khimiya. 2013; 15(3): 67-74. [in Ukrainian]
- Prylutska SV, Remenyak OV, Honcharenko YuV, Prylutskiy YuI. Vuhletsevi nanotrubky yak novyi klas materialiv dlya bionanotekhnolohiyi. Biotekhnolohiya. 2009; 2: 55—66. [in Ukrainian]
- Chekman IS, Serdyuk AM, Kundiyev YuI, ta in. Nanotoksykologhiya: napryamky doslidzhen (ohlyad). Dovkilliya ta zdorovya. 2009; 1: 3-7. [in Ukrainian]
- Anzenbacher P., Zanger UM. Metabolism of drugs and other xenobiotics. Germany: Wiley-VCH; 2012. 724 p.
- Cinti DL, Cinti DL, Moldeus P, Schenkman JB. Kinetic parameters of drug - metabolizing enzymes in Ca^{2+} - sedimented microsomes from rat liver. Biochem. Pharmacol. 1972. 21. 3249–3256.
- Dai L. From conventional technology to carbonnanotechnology: The fourth industrial revolution and the discoveries of C_{60} , carbon nanotube and nano_diamond. Carbon nanotechnology. Elsevier. 2006: 3–11.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. Biol. Chem. 1974. 22: 7130–7139.
- Johnston HJ, Hutchison GR, Christensen FM, Aschberger K, Stone V. The biological mechanisms and physicochemical characteristics responsible for driving fullerene toxicity. Toxicological Sciences. 2010. 114(2): 162–182.
- Klotz AV, Stegeman JJ, Walsh C. An alternative 7-ethoxyresorufin O-deethylase activity assay: a continuous visible spectrophotometric method for measurement of cytochrome P-450 monooxygenase activity. Anal. Biochem. 1984. 140: 138–145.

Реферати

ФУЛЛЕРЕНЫ C₆₀ УСИЛИВАЮТ ТОКСИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ТОЛУОЛА НА СОСТОЯНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ СИСТЕМЫ БИОТРАНСФОРМАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ

Палица Л.М., Корда М.М., Мудра А.Е., Федонюк Л.Я.

Развитие нанотехнологий способствует появлению новых ультрависокосдисперсных форм веществ - наноматериалов, влияние которых на здоровье человека может быть непредсказуемым. Целью данной работы было исследовать эффект комбинации фуллеренов C₆₀ с известным химическим токсикантом толуолом на активность ферментов первой и второй фазы метаболизма ксенобиотиков в печени крыс. Животным интраперитонеально вводили суспензию фуллеренов (60 мг / кг), толуол (0,5 мл / кг) и толуол с растворенными в нем фуллеренами. В динамике (3-72 ч) в микросомах печени определяли активность УДФ - глюкокуронилтрансферазы, этоксиризорифин-О-деэтилазы (ЕРОД), глутатионтрансферазы. Максимальные изменения всех показателей во все сроки исследования наблюдалось в IV группе животных, которым вводили фуллерены, растворенные в токсиканте толуоле. В этом случае активность ЕРОД и УДФ - глюкокуронилтрансферазы достоверно возрастала, а активность глутатионтрансферазы достоверно снижалась по сравнению с животными, которым вводили только толуол. Сделано выводы, что карбоновые наночастицы фуллерены C₆₀ способны усиливать токсическое воздействие химического токсиканта толуола на систему биотрансформации ксенобиотиков.

Ключевые слова: фуллерены, толуол, ферменты биотрансформации ксенобиотиков.

Статья надійшла 26.03.18 р.

FULLERENE C₆₀ STRENGTHEN TOLUENE TOXIC EFFECT ON ENZYMES SYSTEM STATE OF XENOBIOTICS BIOTRANSFORMATION

Palytsia L.M., Korda M.M., Mudra A.E., Fedoniuk L.Y.

The development of nanotechnologies contributes to the emergence new ultra high dispersed substance forms called nanomaterials. Their influence on human health can be unpredictable. The aim of this research is to investigate the effect of fullerenes (C₆₀) combination with known chemical toxicant toluene on the activity of the first and second group enzymes of xenobiotics metabolism phase in rat's liver. Laboratory rats received intraperitoneal injections of fullerene suspension (60 mg/kg), toluene (0.5 ml/kg) or toluene with dissolved fullerenes. UDP-glucuronosyltransferase, ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD), glutathione-S-transferase activity were identified in microsomes liver in as a time series starting in hour 3 of the experiment and up to hour 72. Maximum changes of all data in all research terms are recorded in 4 animal group. Fullerenes dissolved in toxicant toluene were injected to the 4 animal group. In this case EROD toxicant toluene and UDP-glucuronosyltransferase activity was increased accurately and glutathione-S-transferase activity was decreased accurately in comparison with the animals with only toluene injection. The conclusion is that carbon nanoparticles fullerene C₆₀ are able to enforce the toxic influence of chemical toxicant toluene on the system of xenobiotics biotransformation.

Key words: fullerenes, toluene, enzymes of xenobiotics biotransformation.

Рецензент Єрошенко Г.А.

DOI 10.26724/2079-8334-2019-1-67-181

UDC 611.441-018.1:51-7

O.I. Ryabukha

Lviv Medical Institute, Lviv, Ukraine

APPLICATION OF MATHEMATICAL APPROACHES IN MEDICINE ON THE EXAMPLE OF FOLLICULAR THYROCYTES SECRETORY ACTIVITY STUDY

E-mail: oriabuha@ukr.net

Application of the information technologies to the process of data analysis, obtained during medical research, helps find out and explain the activity patterns of certain organs or their systems, their interrelations and interaction, as well as study the main and transitional functioning stages of any biological subject. The very mathematical study itself, being the higher level of cognition, permits to clearly observe the dependency of certain phenomena on other ones, and this gives us the opportunity to formulate hypotheses concerning interdependence of various systems functioning in an integral living organism. The study results of the mathematical approaches application to the study of secretory function of the thyrocyte, the basic morphofunctional thyroid unit have been presented. Development and analysis of the profile correlation pictures concerning the follicular thyrocytes secretory potential and further data integration helped determine the patterns and the peculiarities of the thyrocyte secretory function in various states: normal, increased and decreased functional activity.

Key words: follicular thyrocyte, cytophysiology, correlation analysis, correlation portrait, expert systems.

The paper is a fragment of the research project "Development of prognostic and diagnostic criteria, creation of experimental models, improvement of the metabolic processes disorders treatment at certain diseases of internal organs and skin", state registration number 01164004506.

The fundamental principles of the theory of information and cybernetics are being widely implemented into the theory and practice of many spheres, including medicine which is no longer the empirical science only. Usually, the tool for advanced research of biological objects is an expert system. The study results, obtained with its help, make possible the primary description and data classification; obtaining the comparable results; checking-up of the output concepts and functional dependencies between them; formation of certain medicine sphere patterns [9].

Any organism consists of a number of constituent elements, each of them having their own morphofunctional features [1]. It gives us the possibility to describe the properties of every element in a biological system (using certain parameters) and to determine whether there exist any dependencies between them [5]. Under the influence of various environmental factors, there are constant adequate and