

М.М. Середенко, В.К. Рибальченко, Т.М. Говоруха,
А.І. Назаренко, Г.Б. Філь, В.М. Бабан

Вплив N-окиснених похідних піридину на киснезалежні процеси в тканині печінки щурів

Исследовалось действие N-оксида 2,6-диметилпиридина (ивина) на интенсивность липопероксидации in vivo и in vitro, микросомального гидроксилирования и секреции желчи in vivo. Показано, что препарат существенно не влияет на скорость пероксидации липидов в гомогенатах печени in vivo (5 мг/100 г, 4 нед) и in vitro (10^{-6} - 10^{-2} моль/л, инкубация). Ивин не изменяет активности микросомального гидроксилирования (гексенал), однако стимулирует экскрецию органических и неорганических компонентов желчи. В качестве основных механизмов обсуждаются роль NO как медиатора эффектов N-оксида 2,6-диметилпиридина и его возможное влияние на изучаемые процессы через модификацию структуры биомембран.

ВСТУП

Відомо, що N-окиснені похідні піридину широко застосовуються у медичній (імуномодулятори, кардіостимулятори, анальгетики тощо) та сільськогосподарській (регулятори росту рослин) галузях. Потрапляючи до організму, вони можуть за певних доз чинити побічні ефекти, пов'язані, загалом, із накопиченням нітритів і нітратів у тканинах [9,11], що призводить до гіпоксичного стану [7,13]. Можлива також прооксидантна дія таких біомодуляторів через утворення вільнорадикальних продуктів у процесі біотрансформації як ксенобіотика [20], а також при відщепленні атома водню від молекули, легкість якого залежить від різних факторів [10], з наступною активацією перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) – однієї з найважливіших причин розвитку патології у тканинах [19]. Отже застосування (особливо тривале) цих препаратів потребує коректної оцінки їх біологічної дії. Попри численні дослідження впливу похідних піридину на функціональний стан організму, залишаються недостатньо з'ясованими біохіміч-

ні аспекти цієї дії, особливості ефектів на рівні редокс-реакцій у тканинах. У зв'язку з цим метою наших досліджень було вивчення впливу порогових [10] доз (концентрацій) N-оксиду 2,6-диметилпіридину (івіну) – регулятора росту рослин (PPP) на детоксикаційну, жовчовидільну та окиснювальну активність печінки білих щурів (як киснезалежних процесів).

МЕТОДИКА

Експерименти проведено на статевозрілих білих щурах-самцях масою 200–220 г, а також на ізольованій тканині (гомогенаті) печінки.

У дослідях in vivo PPP вводили тваринам у шлунок за допомогою зонду (5 мг/100 г в 1 мл води протягом 4 тиж). Детоксикаційну функцію печінки (мікросомальної гідроксилюючої системи) оцінювали за тривалістю гексеналового сну у тварин [1], а секреторну функцію – за такими показниками, як об'ємна швидкість жовчотоку, екскреція жовчних кислот і холестерину, а також іонів натрію і калію, холато-холестериновий кое-

фіцієнт. Концентрації органічних компонентів екскрету визначали за методикою Мірошниченко зі співавт. [8], неорганічних – за загальноприйнятим методом фотометрії в полум'ї природного газу [5]. Холато-холестериновий коефіцієнт та екскрецію відповідних інгредієнтів жовчі розраховували на підставі одержаних значень швидкості жовчотоку та концентрації компонентів. Власне окиснювальну активність тканини печінки, що характеризується рівнем ПОЛ, визначали за тестом з 2-тіобарбітуровою кислотою [14].

Контролем були тварини, яким у шлунок вводили лише воду.

У дослідах *in vitro* період інкубації гомогенатів з івіном для спонтанного ПОЛ становив 120 хв, для Fe²⁺-індукованого [15] – 30 хв за однакової для обох варіантів досліджень температури – 37^oC. Концентрації PPP при цьому були: 10⁻⁶, 10⁻⁴, 10⁻² моль/л.

Одержані результати піддавали статистичній обробці із застосуванням критерію t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати досліджень тривалої дії івіну на функціональну активність печінки щурів, пов'язану з редокс-процесами у гепатоцитах, представлено в табл. 1. Видно, що під дію PPP підпадає жовчовидільна функція, а детоксикаційна залишається без змін. Пре-

парат стимулює секреторні процеси в печінці. Це виражається у підвищенні об'ємної швидкості жовчовиділення на 27,5 % (P < 0,05) порівняно з контролем. Розрахунки показали, що у підвищенні рівня жовчотоку беруть участь усі вищезгадані складові: холестерин, холати, іони Na⁺ й K⁺. Про це свідчить збільшення їх екскреції: холестерину – на 61,5 % (P < 0,001), жовчних кислот – на 64,3 % (P < 0,001), іонів Na⁺ – на 30,7 % (P < 0,02), іонів K⁺ – на 22,3 % (P < 0,05). Холато-холестериновий коефіцієнт при цьому не змінюється.

Подібні результати, але лише відносно швидкості жовчотоку та екскреції холатів, були одержані нами раніше у дослідах із внутрішньопортальною інфузією івіну [12].

Щодо рівня процесів ліпопероксидації, то останній практично не зазнає змін при дії івіну. Так, у контролі вміст ТБК-активних продуктів становить 265 нмоль/г ± 18,7 нмоль/г; у тварин “навантажених” PPP – 236 нмоль/г ± 5,8 нмоль/г тканини (P > 0,1). Слід також зазначити, що інкубація гомогенатів печінки з івіном практично не позначається ні на спонтанному, ні на Fe²⁺-індукованому ПОЛ за всіх досліджуваних концентрацій. Лише при концентрації 10⁻² моль/л для спонтанного ПОЛ виявляється тенденція до його зниження (табл.2). Результати певною мірою узгоджуються з даними, наведеними раніше [10].

Таблиця 1. Вплив тривалої дії івіну на функціональний стан печінки білих щурів (M±m)

Схема досліджу	Показники функціональної активності печінки						
	Детоксикаційна функція	Секреторна функція					
		Тривалість гексеналового сну, хв	Об'ємна швидкість жовчотоку, мкл/г·хв	Екскреція холестерину, мг/кг·хв	Екскреція холатів, мг/кг·хв	Холато-холестериновий коефіцієнт	Екскреція Na ⁺ , мг/кг·хв
Введення води (контроль)	24,0±1,7	1,366±0,128	0,52±0,03	7,00±0,32	13,40±2,20	202,0±17,0	6,18±0,40
Введення води та івіну (дослід)	24,5±1,7	1,742±0,087	0,84±0,03	11,50±0,62	13,60±0,26	264,0±15,0	7,56±0,50
		P < 0,05	P < 0,001	P < 0,001		P < 0,02	P < 0,05

Таблиця 2. Вплив N-оксиду 2,4-диметилпіридину за різних концентрацій на спонтанне Fe²⁺-індуковане ПОЛ (нмоль/г тканини ТБК-активних продуктів) у тканині печінки за умов інкубації

Концентрація	Спонтанне ПОЛ		Fe ²⁺ -індуковане ПОЛ	
	Контроль	Дослід	Контроль	Дослід
10 ⁻⁶ ммоль/л	422,0±14,1	450,0± 9,1	960,3±11,5	979,4±20,5
10 ⁻⁴ ммоль/л	302,6± 6,4	312,8± 6,4	1374,4±10,3	1380,8±23,1
10 ⁻² ммоль/л	442,3±11,5	385,9±26,9	1075,6±64,1	1151,3±35,9

Отже, із усіх досліджуваних нами показників зазнає впливу PPP лише жовчосекреторна функція. Яким же чином можна пояснити активацію жовчовидільного процесу за умов тривалої дії івіну? Насамперед слід відзначити підвищення пулу оксиду азоту (NO) у тканині печінки щурів, що підпадали під вплив даного препарату [10]. NO може впливати на активність ферментів, що містять Fe-S-центри та геми, з високою спорідненістю зв'язується з гемом цитохрому P-450 [17]. Повідомляється про активуючий вплив оксиду азоту на деякі білки та ферменти, зокрема, білки іонних каналів, компонентів дихального ланцюга [13]. Зареєстровано стимуляцію Na⁺, K⁺-АТФази ендотелію аорти щурів під дією попередників синтезу NO [16]. Є відомості про здатність NO утворювати нітрозильні комплекси із SH-групами ферментів, білків тощо [4]. Це в свою чергу призводить до підвищення активності тіолів у реакціях окиснення і приєднання різних груп, що може мати в основі функціонального впливу оксиду азоту на процеси, котрі здійснюються за участю сульфгідрильних груп. Якщо врахувати, що сукцинатдегідрогеназа містить SH-групу, то можна припустити активацію тканинного дихання і підвищення енергетичного потенціалу гепатоцитів під впливом івіну. Ці факти можуть бути причиною стимуляції жовчовидільних процесів, тісно пов'язаних з функціями мітохондріальних і мікросомальних редокс-ланцюгів. Інтенсифікація утворення макроергів, можливе підвищення функціональної здатності цитохрому P-450, активація транспорту неорганічних та органічних компонентів жовчі, посилення вза-

ємодії мітохондріальних і мікросомальних ланцюгів переносу електронів при активації сукцинатдегідрогеназної реакції можуть приводити до оптимізації функції жовчоутворення.

Очевидно, існує не один механізм біологічної дії івіну. Можна припустити і безпосередній вплив PPP на біохімічні, а звідти – на фізіологічні процеси. До питання про механізми впливу на біологічні системи можна також віднести здатність похідних піридину до комплексоутворення, зокрема, з металами [10]. При трактуванні механізмів біологічної дії івіну значної уваги може заслуговувати наявність модифікуючого впливу PPP на структуру мембран [2,6]. У зв'язку з цим не виключено вплив N-оксиду 2,6-диметилпіридину на клітинні процеси через зміну активності іонних каналів, мембранозв'язаних ферментів [18]. У цьому ефекті можуть брати участь і продукти перетворення івіну. Припускається [10], що ними є 2-піколінова кислота та N-оксид 2-піколіну. Перший із них, завдяки наявності у молекулі карбоксильної групи, повинен мати антиоксидантні властивості. Можливо, цим і пояснюється зареєстрована тенденція до зниження рівня ПОЛ при 120-хвилинній інкубації гомогенатів печінки з івіном за концентрації 10⁻² моль/л (див.табл. 2).

Таким чином, результати наших досліджень показали, що N-окиснені похідні піридину, зокрема, івін може бути модулятором киснезалежних процесів у тканині печінки теплокровних. З'ясування тонких механізмів цього впливу потребує більш детальних досліджень. Видимий токсичний ефект N-оксиду 2,6-диметилпіридину за поро-

вих доз (концентрацій) на досліджувані показники не спостерігається.

M.M. Seredenko, V.K. Ribalchenko, T.M. Govorukha, A.I. Nazarenko, G.B. Fil, V.M. Baban

N-OXIDIZED PYRIDINE DERIVATIVES INFLUENCE THE OXYGEN-DEPENDENT PROCESSES IN THE LIVER TISSUE OF WHITE RATS

Effects of N-oxide 2,6-dimethylpyridine (ivine) on the intensity of lipid peroxidation (in vivo and in vitro), microsomal hydroxylation and secretion of the bile (in vivo) were investigated. It has been shown that the preparation did not act significantly on the rate of lipid peroxidation in the liver homogenates both in vivo (5 mg/100 g, 4 weeks) and in vitro (10^{-6} - 10^{-2} mol, incubation). Ivin did not change the activity of the microsomal hydroxylation (hexenal), but stimulated the excretion of biliary organic and inorganic components. The role of NO as a transmitter for effects of N-oxide 2,6-dimethylpyridine and the possibility of its influence on the processes under exploration via the modification of the structure of a biomembrane have being discussed to be one of the basic mechanisms.

A.A. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Березовский О.И., Заева Г.И., Мальцева М.М. Санитарно-токсикологическая оценка родентицидных средств из группы антикоагулянтов // Гигиена и санитария. – 2000. – № 3. – С. 62 – 66.
- Бичко А.В. Модифікація структури фосфатидилхолінових БЛМ івіном // Актуал. проблеми гастроентерології. – К.: Вид-во Київ. ун-ту, 2000. – С. 5.
- Ванин А.Ф. Оксид азота в биологии: история, состояние и перспективы исследований // Биохимия. – 1998. – 63. – Вып. 7. – С. 867 – 869.
- Ванин А.Ф., Маленкова И.В. Железо-катализатор 5-нитрозирования цистеина и глутатиона при контакте с оксидом азота в водном растворе при нейтральном рН // Там же. – 1998. – 61. – Вып. 9. – С. 505 – 512.
- Жаліло Л.І., Єсипенко Б.Є., Воробей І.І. та ін. Вплив жовчогінних флавоноїдів на енергетичні процеси в гепатоцитах // Вісн. Київ. ун-ту ім. Тараса Шевченка. – 1993. – Вип. 3. – С. 61 – 65.
- Карпезо Н.О., Гурняк О.М., Резніченко Н.О., Рибальченко В.К. Структурні зміни у печінці щурів під впливом 2,4-дихлорофеноксиоцтової кислоти (2,4-Д) та івіну // Актуал. проблеми гастроентерології. – К.: Вид-во Київ. ун-ту, 2001. – С. 23.
- Маньковська І.М., Назаренко А.І., Носар В.І. та ін. Нові шляхи патогенетичної корекції гемічної гіпоксії // Фізіол. журн. – 1992. – 38, № 2. – С. 43 – 46.
- Мирошниченко В.П., Громашевская Л.Л., Касаткина М.Г., Козачек Г.А. Определение содержания желчных кислот и холестерина в желчи // Лаб. дело. – 1978. – № 3. – С. 149 – 153.
- Поленов С.А. Окись азота в регуляции функций желудочно-кишечного тракта // Рос. журн. гастроэнтерологии, гематологии, колопроктологии. – 1998. – № 1. – С. 53 – 58.
- Пономаренко С.П. Регуляторы роста растений на основе N-оксидов производных пиридина (физико-химические свойства и биохимическая активность). – К.: Техніка, 1999. – С. 272.
- Реутов В.П., Сорокина Е.Г. NO-синтезная и нитритредуктазная компоненты цикла оксида азота // Биохимия. – 1998. – 63. – Вып. 7. – С. 1029 – 1040.
- Рибальченко В.К., Долгова О.М., Говоруха Т.М. та ін. Вплив івіну на жовчосекреторну функцію печінки щурів. – В кн.: Матер. І з'їзду токсикологів України. – К., 2001. – С. 61.
- Середенко М.М., Дударев В.П., Лановенко И.И. и др. Механизмы развития и компенсации гемической гипоксии. – К.: Наук думка, 1987. – 200 с.
- Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Совр. методы в биохимии. – М.: Медицина, 1987. – С. 217 – 221.
- Теселкин Ю.О., Жамбаева Б.А., Бабенкова И.В. и др. Антиоксидантные свойства дигидрокверцетина // Биофизика. – 1996. – 41. – Вып. 3. – С. 620 – 623.
- Харламова О.М., Акопова О.В., Вавілова Г.Л., Сагач В.Ф. Вплив нітропрусиду натрію та L-аргініну на активність Na⁺, K⁺-АТФази ендотелію аорти щура // Механізми фізіологічних функцій в експерименті та клініці. – Львів, 2001. – С.46.
- Хаценко О.В. Взаимодействие оксида азота и цитохрома P-450 в печени // Биохимия. – 1998. – 63. – Вып. 7. – С. 984 – 991.
- Bhalla P., Agrawal D. Alteration in rat erythrocyte membrane due to hexachlorocyclohexane (technicae) exposure // Hum. and Exp. Toxicol. – 1998. – 17, N 11. – P. 638 – 642.
- Carey F.A., Sundberg R.J. Advanced organic chemistry. Part A: Structure and mechanisms; Part B: Reactions and synthesis. – New York – London, 1977. – P. 552.
- Subrahmanyam V.V., Smith M.T. Singlet oxygen production by myeloperoxidase: implication in cytochrome P-450 and neutrophil functions. – In: 10-th Int. Simp. Microsom. Drug Oxidat. – Toronto, 1994. – P. 457.

Ин-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ

Матеріал надійшов до редакції 16.10.2002