

И.Ю. Высоцкий, д. м. н.

СИСТЕМА АДЕНИЛОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ В ДИНАМИКЕ ОСТРОГО ТОКСИЧЕСКОГО ПОРАЖЕНИЯ ПЕЧЕНИ ЛЕТУЧИМИ КОМПОНЕНТАМИ ЭПОКСИДНОЙ СМОЛЫ ЭД-20

Сумской государственный университет, медицинский институт

При синтезе эпоксидных смол (ЭС) и их использовании в производстве для изготовления стеклопластика, многих полимерных материалов рабочие подвергаются постоянному интенсивному воздействию эпихлоргидрина (ЭХГ), толуола, дифенилпропана и других, преимущественно летучих химических веществ, содержание которых в воздухе рабочей зоны превышает ПДК в несколько десятков раз [1-5], что создает условия для острых и хронических профессиональных интоксикаций [6-9].

Эпоксисоединения отличаются высокой токсичностью и политропностью вредного воздействия на организм работающего, что проявляется поражением органов дыхания, желудочно-кишечного тракта, опорно-двигательного аппарата, кожи, почек, а также нарушениями в иммунной и нервной системах [10-15]. Следует особо подчеркнуть, что у рабочих, контактирующих с ЭС, в 15-31% случаев развиваются токсические гепатопатии. Особенностью течения последних является то, что они протекают в тяжелых формах и после проведенного соответствующего лечения при возобновлении контакта с ЭС рецидивируют [1, 16, 17].

Многообразие эффектов летучих компонентов ЭС, их преимущественное влияние на печень позволяют предположить, что в основе действия этих соединений на организм лежат изменения функционирования универсальных систем клеток. Одной из них является адениловая система, отражающая состояние энергетического обмена в клетках.

Целью работы было оценить возможность участия системы адениловых нуклеотидов и фосфора неорганического в реализации гепатотоксического эффекта летучих компонентов ЭС ЭД-20.

Материалы и методы исследования

Опыты проведены на белых крысах-самцах линии Вистар массой 180-230 г. Острое токсическое поражение печени вызывали путем однократного 4-часового ингаляционного динамического воздействия летучими компонентами ЭС ЭД-20 в концентрации, составляющей 1/3 LC_{50} (120-140 мг/м³) по ЭХГ. Ингаляционное отравление осуществляли в затравочной камере общего назначения [18-20] в нашей модификации [21].

Навески ЭС ЭД-20, которые создавали в камере эффективные концентрации летучих композиций, подбирали опытным путем и нагревали в паранасыщающей камере до температуры 90-100 °С. Как ведущий и характерный компонент летучих комплексов ЭС ЭД-20 был взят ЭХГ. Это соединение является постоянным и наиболее токсичным компонентом летучих комплексов ЭС ЭД-20, выделяется в воздушное пространство пропорционально другим сопутствующим компонентам и специфически характеризует ЭС [22]. Все затравки проводили натощак, в одно и то же время суток - в 10 ч утра.

Содержание адениловых нуклеотидов определяли методом электрофореза на бумаге NF-1 с последующей спектрофотометрией на спектрофотометре

СФ-4а при длине волны 260 нм и 290 нм [23]. Концентрацию адениловых нуклеотидов выражали в ммоль/кг влажной ткани, приняв за коэффициент молярной экстинкции 14300. На основании полученных данных рассчитывали показатели энергетического обмена в изучаемых условиях эксперимента: энергетический заряд (ЭЗ) по формуле $ЭЗ = (АТФ + 1/2 АДФ) / (АТФ + АДФ + АМФ)$ [24], энергетический потенциал (ЭП) по соотношению $ЭП = АТФ / АДФ$, термодинамический контроль дыхания (ТКД) по соотношению $ТКД = АДФ / АМФ$, степень фосфорилирования (СФ) по формуле $СФ = АТФ / (АДФ + Ф_n)$ [25], коэффициент сравнения ($K_{сравн.}$) по соотношению $K_{сравн.} = (АТФ / АМФ) / АДФ$ [26] и индекс фосфорилирования (ИФ) по формуле $ИФ = АТФ / (АДФ + АМФ)$ [25].

Неорганический фосфор ($Ф_n$) в ткани печени определяли по методу Delor в модификации В.А. Григорьевой [27]. Концентрацию выражали в ммоль/кг влажной ткани. Пробы печени для исследования забирали через 12; 24; 72 и 120 ч после окончания ингаляционного воздействия летучими компонентами ЭС ЭД-20.

Полученные в эксперименте результаты обрабатывали статистически общеизвестным методом (t — критерий Стьюдента) при помощи программы Microsoft Excel-2003 для Windows [28].

Результаты и их обсуждение

При анализе данных, приведенных в таблице, видно, что уровень АТФ в ткани печени животных при острой динамической ингаляционной интоксикации летучими компонентами ЭС ЭД-20 уже через 12 ч после окончания воздействия токсического агента снижается на 41% в сравнении с группой интактных животных. Этот показатель остается достоверно сниженным во все последующие сроки исследования и на 5 сут после затравки составляет 51% от исходных величин. Полученные данные указывают на стойкость и длительность указанных изменений. Выявленный дефицит в высокоэнергетических фосфатных связях, в частности АТФ, свидетельствует о формировании энергетического дефицита. Кроме того, известно, что снижение уровня АТФ является пусковым моментом акти-

вации фосфолипазы А₂ и дальнейшего ускоренного метаболизма арахидоновой кислоты с последующим высвобождением различных классов простаноидов [29].

Оценивая состояние другого компонента адениловой системы - АДФ, обращает на себя внимание относительно небольшое повышение его уровня в ткани печени животных при острой ингаляционной интоксикации летучими компонентами ЭС ЭД-20. Так, достоверно значимое увеличение уровня АДФ в контроле отмечается лишь в поздние сроки исследования - через 72 и 120 ч в среднем на 36-39%, а в первые 24 ч величина показателя практически не отличается от такого у

интактных животных. Следует отметить, что значимые изменения уровня АДФ отмечаются лишь на фоне максимального снижения содержания АТФ (см. табл.).

Помимо АТФ, наиболее выраженных изменений претерпевает также содержание АМФ в ткани печени животных, подвергшихся ингаляционной интоксикации летучими компонентами ЭС. Так, достоверно повышался уровень данного нуклеотида во все сроки исследования у опытных крыс (на 67-162%) в сравнении с интактными.

При острой интоксикации летучими компонентами ЭС ЭД-20 происходит относительно небольшое (на 10-15%), но довольно стойкое (до

конца 5 сут) снижение суммы адениловых нуклеотидов в печени животных. Динамика изменения суммы адениловых нуклеотидов у крыс при изучаемом патологическом состоянии сходна с таковой при определении содержания в ткани печени АТФ, что свидетельствует о доминирующей роли последнего в составе пула аденилнуклеотидной системы.

Выявленный дисбаланс в системе АТФ-АДФ-АМФ в ткани печени крыс при острой ингаляционной интоксикации летучими компонентами ЭС ЭД-20 свидетельствует о резком нарушении процессов дыхания и окислительного фосфорилирования. Причем уменьшение содержания АТФ и соответствующее

Таблица

Показатели энергетического обмена в печени крыс при острой динамической ингаляционной интоксикации летучими компонентами ЭС ЭД-20 (n=6-8)

Показатели	Стат. показатель	Интактные животные	Сроки исследования после воздействия повреждающих факторов, ч			
			12	24	72	120
АТФ (ммоль/кг)	М ±m p	3,43 0,20	2,02 0,15 <0,001	2,55 0,17 <0,01	1,88 0,09 <0,001	1,77 0,15 <0,001
АДФ (ммоль/кг)	М ±m p	1,45 0,15 -	1,47 0,18 >0,5	1,58 0,09 >0,25	2,01 0,13 <0,02	1,97 0,11 <0,05
АМФ (ммоль/кг)	М ±m p	0,40 0,04 -	1,00 0,07 <0,001	0,67 0,09 <0,05	1,05 0,10 <0,001	0,90 0,12 <0,01
Фосфор неорганический (ммоль/кг)	М ±m p	6,46 0,46 -	6,12 0,43 >0,5	9,27 0,54 <0,01	11,31 0,68 <0,001	10,33 0,78 <0,01
Сумма нуклеотидов (ммоль/кг)	М ±m p	5,28 0,33 -	4,50 0,14 >0,05	4,81 0,27 >0,1	4,94 0,18 >0,25	4,63 0,24 >0,1
Энергетический потенциал	М ±m p	2,43 0,17	1,54 0,20 <0,01	1,62 0,07 <0,01	0,96 0,09 <0,001	0,91 0,09 <0,001
Термодинамический контроль дыхания	М ±m p	3,74 0,39 -	1,51 0,20 <0,002	2,53 0,35 <0,05	2,00 0,16 <0,01	2,38 0,31 <0,05
Энергетический заряд	М ±m p	0,79 0,01 -	0,61 0,02 <0,01	0,69 0,02 <0,01	0,58 0,01 <0,01	0,59 0,02 <0,02
Индекс фосфорилирования	М ±m p	1,90 0,15 -	0,87 0,10 <0,001	1,14 0,08 <0,01	0,64 0,07 <0,001	0,63 0,08 <0,001
Степень фосфорилирования	М ±m p	0,38 0,03 -	0,25 0,03 <0,02	0,18 0,01 <0,001	0,09 0,01 <0,001	0,09 0,01 <0,001
Коэффициент сравнения	М ±m p	0,96 0,10 -	1,52 0,21 <0,05	1,08 0,12 >0,25	0,97 0,09 >0,5	0,80 0,14 >0,25

Примечание: p — в сравнении с интактными животными

увеличение количества АМФ указывает на истощение энергетических ресурсов клетки.

Одновременно определяли содержание Φ_n в ткани печени при интоксикации крыс летучими компонентами ЭС. При этом установлено, что его уровень достоверно ($p < 0,01-0,001$) увеличивается во все сроки исследования за исключением 12-часовой отметки. Как и для большинства других исследуемых показателей аденилнуклеотидного обмена, максимальные изменения количества Φ_n наблюдаются к 3–5 сут эксперимента, когда исследуемый показатель превышает величины, регистрируемые у интактных животных, в 1,6–1,8 раза (см. табл.).

Для всесторонней оценки состояния энергетического обмена при интоксикации летучими компонентами ЭС определяли ряд параметров энергетического гомеостаза (см. табл.).

Установлено, что молярное соотношение АТФ/АДФ, именуемое как "ЭП" клетки и свидетельствующее о скорости дыхания митохондрий в печени животных при моделируемом токсическом процессе, резко уменьшается во все сроки исследования. Причем, если через 12 и 24 ч этот показатель составляет в среднем 63–67%, то на 3 и 5 сут наблюдения – всего лишь 37–40% от уровня, регистрируемого у интактных животных, что еще раз подтверждает стабильность изменений аденилнуклеотидной системы, которые более выражены в поздние сроки после ингаляционного воздействия продуктами ЭС.

Более информативным показателем процессов окислительного фосфорилирования в митохондриях является ТКД, который у животных опытной группы претерпевает су-

щественные изменения во все сроки наблюдения. При этом, наиболее выраженные изменения отмечаются уже через 12 ч наблюдения, когда данный показатель по сравнению с исходным уровнем снижается на 60%. В дальнейшем отмечается тенденция к его восстановлению. Уже к концу первых суток наблюдения ТКД ниже исходных величин лишь на 32%. На приблизительно таком же уровне он сохраняется и к концу 5 суток.

Энергетическое состояние клетки наиболее корректно может быть представлено степенью "заполнения" системы АТФ-АДФ-АМФ высокоэнергетическими фосфатными связями, на что указывает величина ЭЗ клетки. Как видно из таблицы, у животных при острой ингаляционной интоксикации летучими компонентами ЭС ЭД-20 отмечается достоверное ($p < 0,01-0,02$) снижение величины ЭЗ на протяжении всего опыта. Необходимо отметить, что анализируемый показатель во все сроки исследования находится на стационарно сниженном уровне, составляющем 73–87% от исходных величин с более выраженными изменениями на 3 и 5 сут эксперимента, что свидетельствует о дисбалансе энергопотребляющих и энергосинтезирующих процессов.

Энергетический параметр ИФ существенно снижается у животных с моделируемой формой интоксикации летучими компонентами ЭС. Как следует из таблицы, через 12 ч после окончания моделирования изучаемого патологического состояния ИФ составляет всего 46%, через 24 ч – 60%, 72 ч – 34% и 120 ч – 33% от уровня, определяемого у интактных животных, что еще раз доказывает стабильность нарушений энергетического гомеостаза в организме.

У животных при отравлении летучими компонентами ЭС показатель СФ резко (в 1,5–4,2 раза) снижается в сравнении с интактными животными. Интересно, что если через 12 и 24 ч СФ ниже уровня, регистрируемого у "здоровых" животных соответственно на 34% и 53%, то через 72 и 120 ч – в среднем на 76%, что указывает на глубокие нарушения продукции АТФ.

$K_{\text{сравн.}}$, отражающий соотношения прямой и обратной реакций превращений АДФ, претерпевает разнонаправленные изменения в условиях изучаемого патологического состояния. Как видно из таблицы, $K_{\text{сравн.}}$ у отравленных крыс в ранние сроки исследования (12 ч) возрастает на 58%, а в дальнейшем (до конца 5 сут) снижается лишь на 16% в сравнении с интактными животными. Изменения этого показателя через 24 и 72 ч были статистически не достоверными.

Таким образом, изменения состояния адениловых нуклеотидов и показателей биоэнергетических процессов в ткани печени у животных при острой динамической ингаляционной интоксикации летучими компонентами ЭС ЭД-20 характеризуются значительным уменьшением уровня АТФ, суммы адениловых нуклеотидов с одновременным существенным повышением уровня АМФ и Φ_n . Дисбаланс в системе АТФ-АДФ-АМФ при изучаемом патологическом состоянии, сопровождаемый соответствующим уменьшением величины соотношения АТФ/АДФ, показателей ЭЗ, СФ и ИФ, свидетельствует о резком угнетении процессов окисления и фосфорилирования и указывает на необходимость рациональной фармакокоррекции нарушений энергетического обмена.

ЛИТЕРАТУРА

1. Витрищак В.Я. Гепатотоксические и иммунные нарушения у работающих с эпоксидными композициями, их раннее выявление, коррекция и первичная профилактика: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — Ростов-на-Дону, 1990. — 26 с.
2. Методические рекомендации по гигиеническим требованиям к условиям труда и профилактики заболеваний работающих в производстве эпоксидных смол и пластмасс на их основе (А.М. Шевченко, А.П. Яворовский, Г.А. Гончарук и др.) — К., 1988. — 20 с.
3. Методические рекомендации. Оздоровление условий труда и профилактика профессиональных заболеваний в промышленных производствах стеклопластиков / В.В. Манфановский, В.И. Дынник, А.Н. Тимченко и др. — Харьков, 1987. — 22 с.
4. Сучасні погляди на механізми дії эпоксидних сполук на організм людини (О.П. Яворовський, Л.О. Куюн, Ю.О. Паустовський, В.І. Зенкіна) // Довкілля та здоров'я. — 2005. — № 3. — С. 3–10.
5. Профилактика профессиональных и производственно обусловленных заболеваний при получении и применении эпоксидных соединений (А.П. Яворовский, А.М. Шевченко, И.А. Парпалей и др.) / Гігієнічна наука та практика на рубежі століть: Матеріали XIV з'їзду гігієністів України (19–21 травня 2004 р.). — Дніпропетровськ: АРТ-ПРЕС, 2004. — Т. 2. — С. 133–135.

6. Гайворонская М.А., Парпалей И.А. Ранние клинические расстройства у рабочих, контактирующих с эпоксидными соединениями // Мед. новости. -1998. — № 1. — С. 71-72.
7. Паустовський Ю.О. Гігієнічна оцінка впливу епоксидних композицій на репродуктивну функцію жінок в умовах виробництва та обґрунтування оздоровчих заходів: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Київ, 1999. — 19 с.
8. Exposure to epichlorohydrin and dimethylformamide, glutathione-S-transferases and sister chromatid exchange frequencies in peripheral lymphocytes / T.J.Cheng, S.J.Hwang, H.W.Kuo et al. // Arch Toxicol. — 1999. — V. 73, № 4-5. — P. 282-287.
9. Risk of contact allergy and dermatitis at a wind turbine plant using epoxy resin-based plastics / K. Rasmussen, O. Carstensen, A. Ponten et al. // Int. Arch. Occup. Environ. Health. — 2005. — V. 78, № 3. — P. 211-217.
10. Шевченко А.М., Яворовский А.П. Профилактика профинтоксикаций при производстве и применении эпоксидных смол. — К.: Здоров'я, 1985. — 96 с.
11. Ли Я.Б. Токсикологическая оценка новой эпоксидной смолы и композиционных материалов на ее основе // Соврем. пробл. токсикол. — 2001. — № 1. — С. 48-50.
12. Expression of microsomal epoxide hydrolase is elevated in Alzheimer's hippocampus and induced by exogenous -amyloid and trimethyltin (L. Mei, S. Anyang, Sh. Eun-Joo et al.) // European J. Neuroscience. — 2006. — V. 23, № 8. — P. 2027-2034.
13. Involvement of oxidative stress in mutagenicity and apoptosis caused by dental resin monomers in cell cultures (D.H. Lee, B.S. Lim, Y.K. Lee et al.) // Dent. Mater. — 2006. — T. 22, № 12. — P. 1086-1092.
14. Spee T., Van Duivenbooden C., Terwoert J. Epoxy resins in the construction industry // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 2006. — № 1076. — P. 429-438.
15. Гречишкіна Т.П. Особливості будови слизової оболонки шлунку шурів при надходженні в організм летких компонентів епоксидної смоли ЕД-20 та профілактичному введенні кверцетину: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. — Київ, 2004. — 17 с.
16. Шефтель В.О. Вредные вещества в пластмассах. — М.: Химия, 1991. — 544 с.
17. Hunag T.H., Lii C.K., Kao C.T. Root canal sealers cause cytotoxicity and oxidative damage in hepatocytes // J. Biomed. Mater. res. — 2001. — V. 54, № 3. — P. 390-395.
18. Токсикологическая оценка летучих веществ, выделяющихся из синтетических материалов / Под ред. И.М. Трахтенберга. — К.: Здоров'я, 1968. — 196 с.
19. Методы определения токсичности и опасности химических веществ / Под ред. И.В. Саночко. — М.: Медицина, 1970. — 344 с.
20. Яворовский А.П. Гигиена труда при получении и переработке эпоксидных смол и пластических масс: Дис. д-ра мед. наук: 14.00.07. — К., 1990. — 494 с.
21. Высоцкий И.Ю. Патоморфологические критерии эффективности ацетилцистеина и липина при токсическом поражении печени летучими компонентами эпоксидной смолы ЭД-20 // Вісник СумДУ. — 1999. — № 2(13). — С. 142-149.
22. Шумская Н.И., Толгская М.С. Токсикологические и морфологические исследования при воздействии эпоксидных смол и их исходных продуктов / Токсикология новых промышленных химических веществ. — М.: Медицина, 1965. — Вып. 7. — С. 79-90.
23. Sato T.K., Thomson J.F., Danforth W.T. Electrochromatographic separation of inorganic phosphate, adenosine monophosphate, adenosine diphosphate and adenosine triphosphate // Analit. Biochem. — 1963. — № 5. — P. 542-547.
24. Fosslien E. Adverse effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the gastrointestinal system // Ann. Clin. Lab. Sci. — 1988. — № 2. — P. 67-81.
25. Стайер Л. Биохимия. — М.: Мир, 1983. — Т. 2. — 312 с.
26. Чобитько В.Г., Захарова Н.Б., Губин В.И. Взаимосвязь нарушений обмена тиамина и энергетических процессов в эритроцитах больных сахарным диабетом и пути их лекарственной коррекции // Вопр. мед. химии. — 1986. — Вып. 3. — С. 118-121.
27. Григорьева В.А. Интенсивность обновления фосфорных соединений в мышцах при денервировании // Укр. биохим. журн. — 1958. — Т. 30, № 3. — С. 356-367.
28. Додж М., Кината К., Стинсон К. Эффективная работа с Microsoft Excel 97. — СПб.: ЗАО "Издательство Питер", 1999. — 1072 с.
29. Effects of oxygen tension and shear stress on human endothelial cell prostacyclin production (H.M. Soler, M.T. Watkins, H. Albadawi et al.) // J. Surg. Res. — 1997. — V. 67, № 1. — P. 46-53.

І.Ю. Висоцький

СИСТЕМА АДЕНІЛОВИХ НУКЛЕОТИДІВ У ДИНАМІЦІ ГОСТРОГО ТОКСИЧНОГО УРАЖЕННЯ ПЕЧІНКИ ЛЕТКИМИ КОМПОНЕНТАМИ ЕПОКСИДНОЇ СМОЛИ ЕД-20

У дослідях на білих щурах-самцях лінії Вістар масою 180-230 г встановлено, що гостре інгаляційне ураження печінки леткими компонентами епоксидної смоли ЕД-20 (ЕС) у концентрації 120-140 мг/м³ по епіхлоргідрину характеризується значним зменшенням у печінці рівня АТФ, суми аденілових нуклеотидів з одночасним достовірним підвищенням вмісту АМФ і фосфору неорганічного (Ф_{in}). Встановлений дисбаланс у системі АТФ-АДФ-АМФ-Ф_{in} свідчить про пригнічення леткими компонентами ЕС процесів окислення і фосфорилювання в мітохондріях гепатоцитів.

I. Yu. Vysotsky

SYSTEM OF ADENYLIC NUCLEOTIDES IN DYNAMICS OF ACUTE AFFECTION OF LIVER BY VOLATILE COMPONENTS OF EPOXY RESIN ED-20

The experiment was made on white rat-males line Wistar weight 180-230 g. It was showed that acute inhalatory affection of liver by volatile components of epoxy resin ED-20 (ER) in concentration 120-140 mg/m³ by epichlorohydrine is characterized by considerable decrease of level of ATP, sum of adenylic nucleotides with simultaneous reliable increase of content of AMP and phosphorus inorganic (P_{in}) in liver. Determined imbalance in system ATP-ADP-AMP-P_{in} is an evidence of inhibition of processes of oxidation and phosphorylation in mitochondria of hepatocytes by volatile components of ER.