

УДК 615.275.4.015.4.

Б. М. Галкін, І.Є. Барінова, В. Е. Осетров, Т. О. Філіпова, Т. Ю. Степанова,
Л.І. Храпенко, В. В. Боломса

Одеський Національний університет ім. І.І. Мечнікова, ПНДЛ-5,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 270026, Україна, 635761

ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИОКСИДАНТНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ СЕЛЕНОРГАНІЧНИХ І СЕЛЕННЕОРГАНІЧНИХ СПОЛУК НА МОДЕЛІ НАБРЯКУ ЛЕГЕНІВ

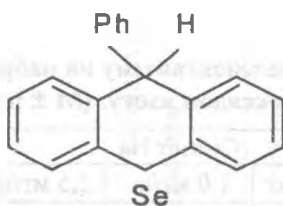
Розглядається проблема застосування селенорганічних і селеннеорганічних сполук як антиоксидантів. Встановлено, що обидві речовини мають антиоксидантні властивості, але селеніт Na менш токсичний.

Ключові слова: антиоксиданти, сполуки, селен.

Проблема створення антиоксидантів синтетичного і природного походження в останні десятиліття успішно вирішується як у нашій країні, так і за кордоном. Проте, знайти універсальний засіб, купуючий оксидантний стрес і не викликаючи побічних ефектів, доки не вдається. Дотепер немає однозначної відповіді що ефективніше, синтетичні чи природні антиокислювачі. Обґрунтування ролі антиоксидантів як захистного, профілактичного чи лікувального засобу при широкому спектрі патологічних станів з різким посиленням вільнорадикального окислювання вперше подано Б. М. Тарусовим [1]. Антиокислювачі біогенного походження не порушують і не гальмують біологічного ферментативного окислювання, що є основою біоенергетики. До них відносяться токоферол, аскорбінова кислота, цистеїн, глутатіон і т. д. До синтетичних антиокислювачів відносять антибіотики, різні модифікації амінокислот та ін. Необхідно відзначити, що синтетичним антиоксидантам властива наявність побічних ефектів при значно менших дозах, ніж природним. Вибір оптимальних дозувань, при яких не будуть розвиватися конкурентні відносини, дуже трудомістка задача. Метою нашої роботи було вивчення антиокислювальних властивостей сполук селену для з'ясування можливості їхнього використання як препаратів з антиокисним типом дії.

Матеріали і методи

Усі дослідження були проведені на мишах-самцях лінії СТВА масою 15—18 мг, що містилися в стаціонарних умовах віварію. Для створення моделі окисного стресу використовували камеру проточного типу об'ємом 0,1 м³. Одбір проб для контролю за концентрацією диоксида азоту проводили без розгерметизації камери. Концентрацію NO₂ визначали хімічним методом з використанням реактиву Гріса-Ілосвая [2] по каліброваній кривій і виражали в мг/м³. Вивчені сполуки вводили мишам внутріочеревино, однократно за 20 хв. до обробки NO₂. Для скринінгу були обрані селеніт натрію і селеноксатен (9-феніл-симетричний октагидроселеноксатен) Брутто формула C₁₉H₂₂Se.



Тварини витримувались у камері 60 хв. при концентрації диоксиду азоту 600—800 мг/м³. За даними концентраціями загибель була 60-80% у групі, після чого досліджували первинну антитоксичну активність, для чого проводили підрахунок імовірності загибелі тварин у відсотках, відносини сирової маси легень до маси тіла (ЛК), коефіцієнта гідратації (КГ), сухого залишку, збільшення кровонаповнення (ПКЛ), коефіцієнта інтенсивності летальності (коефіцієнт Капуссинера) [3]. Визначали дозову залежність між концентрацією NO₂ і летальністю експериментальних тварин [4]. Для проведення біохімічних досліджень концентрацію NO₂ у камері підтримували в межах 200-400 мг/м³, що викликало 20-40% загибелі експериментальних тварин. Визначали вміст аскорбата [5], відновленого глутатіону [6], глутатіонредуктази [7], глутатіонпероксидази [8] у легенях. Активність перекисного окислювання ліпідів (ПОЛ) визначали за методом [9]. Статистичну обробку результатів проводили методом середньої арифметичної і її середньої квадратичної помилки за критерієм вірогідності Стьюдента [10].

Результати досліджень

Роль селену у живому організмі дуже значна, він входить до складу ферментів форміатдегідрогенази, гліциноредуктази, глутатіонпероксидази, де розташовується у активному центрі. Завдяки спроможності замінювати сірку, він здатний зв'язуватися з вільним цистеїном і включатися в білки. У живих організмах селен присутній у вигляді комплексів з низько- і високомолекулярними білками. У ході роботи було з'ясовано, що попереднє введення селеніту натрію в дозах 0,5-2,5 мг/кг маси тіла частково захищає тварин від загибелі (таб. 1). Так, при першій дозі речовини ПЛ знижується на 30%, при другий – на 50%. Подальше збільшення дози сполуки (у 5 разів) викликало зворотний ефект – відсоток летальності збільшувався, що, на нашу думку, зв'язано з токсичністю самої речовини. Коефіцієнт Капусинера, в залежності від дози, зростав у 3,2; 3 і 1,5 рази, відповідно. На показники набряку препарат істотного впливу не робив. ЕД₅₀ складав 1,0±0,3 мг/кг маси тіла. Дослідження, проведені на різних концентраціях NO₂ показали, що ЕД₅₀ селеніту натрію зрушує концентрації Cl₁₆, Cl₅₀, Cl₈₄ у 1,5; 1,4 і 1,4 рази відповідно, а коефіцієнт ефективності дорівнює 1,43. Селеноксантен практично не впливав на летальність експериментальних тварин, але зменшував рівень КГ на 23% порівняно з інтактним контролем. Коефіцієнт Капусинера зростав у 1,1-1,7 рази в залежності від дози речовини. Введення цієї сполуки викликало зрушення величин NO₂, що викликають Cl₁₆, Cl₅₀, Cl₈₄, а КЕ при дозі 1,0 мг/кг маси тіла складав 1,19, що вказувало на незначний захисний ефект. В основу вивчення антиоксидантних властивостей запропонованих сполук необхідно покласти вивчення процесів ПОЛ і всі зміни, зв'язані з цим механізмом. Їх можна підрозділити на структурні і функціональні, ферментативні і неферментативні.

Таблиця 1.

Вплив селеніту натрію і селеноксантену на набряк легенів мишей, викликаний діоксидом азоту. ($M \pm m$; $n = 10$)

	Контроль	Селеніт Na			Селеноксантен		
	-	0,5 мг/кг	1,0 мг/кг	2,5 мг/кг	0,5 мг/кг	2,5 мг/кг	10 мг/кг
% легаль.	90	60	40	100	60	70	100
ЛК	14,8 $\pm$ 0,7	17,1 $\pm$ 1,1	15,8 $\pm$ 1,2	18,5 $\pm$ 0,6	17,4 $\pm$ 0,7	18,3 $\pm$ 1,6	17,8 $\pm$ 1,1
КГ	7,1 $\pm$ 0,2	6,7 $\pm$ 0,5	7,0 $\pm$ 0,4	7,4 $\pm$ 0,3	6,6 $\pm$ 0,3*	7,0 $\pm$ 0,4	7,1 $\pm$ 0,3
ПКЛ	2,5 $\pm$ 0,2	2,1 $\pm$ 0,5	2,4 $\pm$ 0,4	2,8 $\pm$ 0,3	2,0 $\pm$ 0,3*	2,4 $\pm$ 0,4	2,5 $\pm$ 0,5
CL ₁₆ мг/м ³	350 $\pm$ 35	-	531 $\pm$ 47*	-	450 $\pm$ 54	-	-
CL ₅₀ мг/м ³	569 $\pm$ 62	-	813 $\pm$ 94*	-	675 $\pm$ 76	-	-
CL ₈₄ мг/м ³	738 $\pm$ 84	-	1025 $\pm$ 150	-	850 $\pm$ 80	-	-
К эф.	-	-	1,43	-	1,19	-	-
К кап.	0,28	0,89	0,84	0,43	0,96	0,66	0,41

* – вірогідність розходжень при $P \leq 0,05$

У таблиці 2 представлені дані по впливу вивчених речовин на інтенсивність ПОЛ. Встановлено, що NO₂ збільшує рівень спонтаного ПОЛ у 2 рази. Одночасно з цим активізується як аскорбатзалежне, так і НАДФН-залежне ПОЛ, а співвідношення процесів зсувається у бік неферментативних реакцій, що вказує на деструктивний характер NO₂ як прооксиданта. Введення селеноксантену викликало зменшення швидкості спонтаного ПОЛ на 63%, а швидкість неферментативного ПОЛ була блокована у 2 рази в порівнянні з затравочним контролем. Вивчена сполука як у інтактних тварин, так і у оброблених NO₂, підвищувала числові значення ферментативних процесів, що вказує на роль селеноксантена в активації біогенних регуляторів у легенях, що утворюються з ненасичених жирних кислот за допомогою пероксидаційних процесів. Введення селеніту Na викликало посилення швидкості спонтаного ПОЛ на 26,8%. Подібна тенденція зберігалася і при вивченні змін швидкості аскорбатзалежного ПОЛ (збільшення швидкості на 10,6%) і НАДФН-залежного ПОЛ (збільшення на 26,1%). Як природні антиоксиданти, аскорбінова кислота і відновлений глутатіон відіграють велику роль у патогенезі токсичного набряку легень. Варіювання їхнього змісту

Вплив селеномістних сполук на інтенсивність ПОЛ у легенях мишей у нормі та при дії NO_2 (M+m; n=6-8)

Варіант	Доза Мг/кг	Спонтанне ПОЛ		Аскорбатзалежне ПОЛ		НАДФН-залежне ПОЛ	
		Нмоль/мг б. хв		Нмоль/мг б. хв		Нмоль/мг б. хв	
Контроль	-	1,31±0,1	2,74±0,20*	10,6±0,50	22,8±1,2*	15,4±1,4	25,6±0,9*
Селеноксантен	2,5	1,37±0,9	1,0±0,30*	11,2±1,40	11,3±1,6*	20,2±2,7	18,3±2,5*
Селеніт Na	1,0	1,42±0,2	1,8±0,25	12,3±1,5	13,6±1,6*	17,6±3,2	22,2±4,5

*- верогідність розходжень з контролем $P \leq 0,05$

Таблиця 3.

Вміст відновленого глутатіону, аскорбінової кислоти, зміна активності глутатіонпероксидази і глутатіонредуктази при окислювальному стресі і введенні сполук селену. (M+m, n=5-7)

Варіант	Доза мг/кг	Аскорбінова к-та мг/г тканини		Відновлений глутатіон мг%		Активність GSH-ред. мкМ GSH/хв*мг б.		Активність GSH-пер. мкМ GSSG/хв*мг б.	
		інтакт	NO_2	інтакт	NO_2	інтакт	NO_2	інтакт	NO_2
Контроль	-	1,93±0,3	0,83±0,09*	57,6±7,3	39,4±3,00*	68,7±6,9	35,6±5,2*	7,8±0,8	3,4±0,2
Селено- ксантен	2,5	0,6±0,05*	0,4±0,03*	52,4±7,8	56,7±3,60*	59,8±9,8	45,7±4,2	11,4±0,9*	8,1±0,7*
Селеніт Na	1,0	1,2±0,3	1,1±0,2	56,5±6,2	61,3±7,0	64,6±7,3	52,1±4,8*	13,7±1,0	9,5±0,9*

* - верогідність розходжень з контролем $P \leq 0,05$

може приводити до зміни неферментативного і ферментативного захисту від оксидантного стресу. У ході наших досліджень було встановлено, що попереднє введення селеноксантену та селеніту Na не захищає вітамін С від токсического впливу NO_2 , але значно збільшує концентрацію GSH, що свідчить про наявність антиоксидантних властивостей (таб. 3). Відома активна участь глутатіонпероксидази в захисті клітин від окисного стресу. Встановлено, що селеноксантен та селеніт Na активують цей фермент при інтоксикації NO_2 . Ці сполуки в 1,46 та 1,44 рази, відповідно, підвищували швидкість пероксидазній реакції, та були індуктором глутатіон-пероксидази.

На підставі вищевикладеного можна ствердити, що неорганічні сполуки селену є більш перспективними для подальших іспитів з метою створення препаратів антирадикального типу дії. Це обумовлено їх більш низькою токсичністю. Механізм їхньої дії, на нашу думку, зв'язаний з індукцією Se-залежної глутатіонпероксидази – одного з основних ферментів другої фази ферментативного антиокисного захисту організму.

Література

1. Журавлев А. И. Биоантиокислители в животном организме /В кн.: Биоантиокислители. М.: Наука. — 1975. — с.15—29
2. Другов Ю. С., Беликов А. П. Методы анализа загрязнений воздуха. М.: Химия. — 1984. — 364 с.
3. Logan R. The effect of x-irradiation on the uptake of nuclies acids and protein precursors by isolated rabbit livers, appendix and thymus nucler //Biochem. Biophys. Acta. — 1959. — v.35. — №1. — p.251-253
4. Урюпов О. Ю. Скрининг антигипоксических средств на модели гемической гипоксии / Итоги науки и техники. Фармакология. Химиотерапевтические средства. М.: ВИНТИ. — 1991. — С.145
5. Руководство к практическим занятиям по биохимии /Под ред Березова Т. М.: Медицина. — 1976. 294 с.
6. Методы биохимических исследований. /Под ред. М. И. Прохоровой. Л.: Изво Лен-го ун-та. — 1982. — 272 с
7. Горчакова И. А. Фармакология глутаминовой кислоты и ее соединений //Фармакол. и токсикол. — 1990. — №25. — с.10-17
8. Пахомова В. А., Крюкова Г. Н. Способ определения активности глутатионпероксидазы в биологических тканях /А. с.№922637 СССР, ЛЕКИ д 01 №33/48. Оpubл. 23.04.92. — №15. — 2с.
9. Современные методы в биохимии. Под ред. Ореховича В. И. М.: Медицина. — 1977. — с.66-68
10. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. М.: Высшая школа. — 1985. — 320с.

Б. Н. Галкин, д. б. н.; И. Е. Барінова, к. б. н.; В. Е. Осетров, к. б. н.;
Т. О. Филиппова, д. б. н.; Т. Ю. Степанова, Л. И. Храпенко, В. В. Болонса
Одесский Национальный университет им. И. И. Мечникова,
Лаб. Синтеза лекарственных препаратов
ул. Дворянская, 2, Одесса, 270026, Украина, 635761

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ СЕЛЕНОРГАНИЧЕСКИХ И СЕЛЕННЕОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ НА МОДЕЛИ ОТЕКА ЛЕГКИХ

Резюме

Рассматривается проблема применения селенорганических и селеннеорганических соединений в качестве антиоксидантов. Установлено, что оба вещества обладают антиокислительными свойствами, но селенит Na менее токсичен.

Ключевые слова: антиоксиданты, соединения селена.

Galkin B. N., Barinova I. E., Osetrov V. E., Philippova T. O., Stepanova T. Yu., Hrapenko L. I., Bolomsa V. V.

Odessa National university by I. I. Mechnikov,
Dvorianskaya St., 2, Odessa, 65026, Ukraine, 635761

RESEARCH ANTIOXIDANTS OF PROPERTIES SELENORGANICS AND SELENNONORGANICS OF BONDS ON MODEL OF A FLUID EDEMA

Summary

The problem of application selenorganics and selennonorganics of bonds is surveyed as antioxidants. Fixed, that both materials have antioxidative properties, but the selenite Na is less toxic.

Key words: antioxidants, bond of selenium.