УДК 54-32:615.326

ДЕТОКСИКАЦИЯ ПОЛИХЛОРИРОВАННЫХ БИФЕНИЛОВ ГУМИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ ПЕЛОИДОВ

Жданова А.В., Аввакумова Н.П., Кривопалова М.А., Глубокова М.Н., Катунина Е.Е., Агапов А.И.

ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения России, Самара, e-mail: kaf_chem2012@mail.ru

Одним из важных направлений фармации является создание препаратов на основе соединений природного происхождения, обладающих антиоксидантными свойствами, с целью применения их для профилактики, лечения и коррекции окислительно-восстановительных процессов организма. В работе проведено изучение влияния гуминовых кислот низкоминерализованных иловых сульфидных грязей на процессы свободнорадикального окисления в условиях *in vivo* при воздействии полихлорированных бифенилов. Воздействие полихлорированных бифенилов вызывает окислительный стресс у лабораторных животных и существенно изменяют показатели параметров хемилюминесценции, которые достигают своего максимума на третьи сутки. Установлено, что исследуемая фракция гуминовых кислот пелоидов приводит показатели хемилюминесценции к норме при окислительном стрессе, моделированном острым отравлением полихлорированными бифенилами. Доказано детоксицирующее действие гуминовых кислот пелоидов, которые достоверно понижают и приводят в норму показатели хемилюминесценции. Показана возможность применения Fe^{2+}-индуцированной хемилюминесценции для оценки антиоксидантных свойств пелоидопрепарата на основе гуминовых кислот.

Ключевые слова: антиоксидантные свойства, окислительный стресс, пелоиды, гуминовые кислоты, полихлорированных бифенилы

DETOXIFICATION OF POLYCHLORINATED BIPHENYLS BY HUMIC ACIDS OF PELOIDS

Zhdanova A.V., Avvakumova N.P., Krivopalova M.A., Glubokova M.N., Katunina E.E., Agapov A.I.

The Samara State Medical University, Samara, e-mail: kaf_chem2012@mail.ru

One of the important directions of pharmacy is creation of drugs on the based on compounds of a natural origin with antioxidant properties. These drugs are used for prevention, treatment and correction of redox processes in the body. There is study of the influence of humic acids low mineralized silt sulphidic muds on the processes of free radical oxidation in vivo conditions when exposed to polychlorinated biphenyls spent in this work. Influence of the polychlorinated biphenyls cause oxidative stress in laboratory animals and significantly alter the parameters of chemiluminescence, which reaches its maximum at the third day. It was found that the investigated fractions of humic acids of peloids lead indicators of chemiluminescence to the norm under oxidative stress, simulated acute poisoning polychlorinated biphenyls . Antioxidant activity of components of peloids is proved, which significantly reduced and lead to normal indicators of chemiluminescence. The possibility of using Fe^{2+} induced chemiluminescence to measure the antioxidant properties of drugs peloids based on humic acids is shown.

Keywords: antioxidant properties, oxidative stress, peloids, humic acid, polychlorinated biphenyls

В современных условиях развития научно-технического прогресса человечество подвергается тотальному воздействию неблагоприятных факторов внешней среды. К XXI столетию в биосфере накопилось около 4 миллионов токсических веществ, среди которых потенциально опасны и биодоступны около 100 тысяч ксенобиотиков [3]. По данным медицинской статистики, более 80 % болезней обусловлены загрязнением окружающей среды.

Известно, что развитие целого ряда патологических состояний организма человека сопровождается усилением образования активированных кислородных метаболитов и свободных радикалов, которые могут вызвать повреждение биологически важных молекул и в конечном итоге привести к гибели клетки [2]. Свободнорадикальное окисление и, в частности, пероксидное окисление липидов играет важную роль в патогенезе инфаркта миокарда, атеросклероза, бронхолегочных и других заболеваний [5]. Активация реакций свободнорадикального окисления наблюдается при воздействии внешних факторов (радиация, табачный дым, смог, промышленная пыль), при большинстве патологий, а также при употреблении ряда лекарственных препаратов.

Наибольшую опасность среди токсикантов представляют полихлорированные бифенилы, обладающие чрезвычайно высокой физико-химической стабильностью и устойчивостью к биологической деградации.

Благодаря высокой липофильности, хлорбифенилы обладают выраженной способностью к аккумуляции в звеньях пищевой цепи и далее в органах с высоким содержанием липидов и интенсивным стероидогенезом (нервная ткань, надпочечники, яичники, яички) [7]. В результате интоксикации бифенилами выявляются изменения нервной, иммунной, эндокринной, кардиоваскулярной и репродуктивной систем, развитие гепатотоксических, канцерогенных и других эффектов [6, 8, 9]. Хлорпроизводные бифенилы в организме вызывают окислительный стресс, способствуя развитию острых и хронических заболеваний, для профилактики и лечения которых необходимы эффективные антиоксиданты, способные подавить свободнорадикальное окисление.

В связи с вышеизложенным одним из приоритетных направлений фармации является создание препаратов, обладающих антиоксидантными свойствами, с целью применения их для коррекции процессов, сопровождающихся усилением свободнорадикальных реакций. За последние десятилетия в медицине и фармации резко возрос интерес к лекарственным средствам природного происхождения, имеющим ряд преимуществ перед синтетическими аналогами, к которым следует отнести отсутствие побочных эффектов и более мягкое терапевтическое действие.

Широкие перспективы для практического использования в качестве лекарственных препаратов антиоксидантного действия представляют биологически активные вещества растительного происхождения, содержащие компоненты флавоноидной природы [4]. Интересными с точки зрения антиоксидантных свойств являются специфические органические вещества почв и торфов – гумусовые кислоты [10]. На наш взгляд, перспективной группой природных соединений являются низкоминерализованные иловые сульфидные грязи, формирование которых в гидротермальных условиях при незначительном перепаде температур, длительном периоде биологической активности, отрицательном значении редокс-потенциала, обусловленного наличием SH-групп, обуславливает их антиоксидантные свойства. Информация в литературе об антиоксидантных свойствах специфических органических веществ пелоидов представлена незначительным количеством работ [1]. Преобладающим компонентом гумусловых кислот пелоидов являются гуминовые кислоты. Это группа родственных высокомолекулярных соединений с высоким содержанием фенольных гидроксилов, способных к образованию комплексов с переносом заряда.

Целью данной работы является исследование детоксикационной активности гуминовых кислот пелоидов в модели окислительного стресса, вызванного хлорбифенилами методом Fe^{2+}-индуцированной хемилюминесценции, который позволяет регистрировать коротко живущие радикалы супероксидного и синглетного кислорода, а также гидроксильные радикалы перекисного характера.

Объектом исследования явились гуминовые кислоты, выделенные из низкоминерализованных иловых сульфидных грязей Поволжского региона. Препарат представляет собой темно-бурые, почти черные игольчатые кристаллы с металлическим блеском, нерастворимые в воде, растворимые в щелочах и выпадающие в осадок при кислотности растворов меньше двух единиц показателя кислотности.

Экспериментальные исследования выполнены на белых беспородных крысах половозрелого возраста массой 180–220 г в соответствии с «Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей» (Страсбург, 1996). Окислительный стресс животных вызывали действием раствора смеси полихлорированных бифенилов торговой марки «Совол», содержащий 26% тетра-, 64,6% пента- и 9% гексахлорбифенилов в оливковом масле в дозе 600 мг/кг (0,1 LD_{50}). Лабораторный эксперимент осуществлялся с использованием трех групп животных (по 10 особей в каждой), первая из которых являлась контрольной. У животных второй и третьей групп моделировали острое отравление путем однократного введения полихлорированных бифенилов в дозе 0,1 $ЛД_{50}$, с помощью специального металлического зонда. Животные контрольной группы получали оливковое масло (1-ая группа). Животным контрольной группы и группы сравнения (2-ая группа) вводили по 0,2 мл физиологического раствора (0,9% NaCl). Животным третьей группы однократно вводили подкожно инъекцию 0,2 мл 0,1%-ного раствора гуминовых кислот (ГК).

Длительность эксперимента составляла десять суток, в течение которых каждые сутки для контроля параметров осуществлялся забор крови. Показатели крови исследовали с помощью хемилюминесцентного анализа,

который позволяет регистрировать интенсивность процесса свободнорадикального окисления непосредственно в крови. В качестве люминоформа использовали гептагидрат сульфата железа (II), который в виде 0,05 М раствора добавляли в объеме 1 мл к 1 мл плазмы крови. Параметры свечения регистрировали с использованием отечественного хемилюминометра ХЛ-003.

Для определения детоксицирующего действия гуминовых кислот исследуемые образцы крови анализировали с помощью Fe^{2+}-индуцированной хемилюминесценции и определяли от момента введения ионов железа (II) показатели медленной вспышки, амплитуду медленной вспышки (максимальная светимость – H Fe^{2+}), светосумму (S Fe^{2+}), спонтанную светимость (Sp), а также латентный период (R). Обработку хемилюминограмм производили с помощью специализированной компьютерной программы по Р.Р. Фархутдинову и В.А. Лиховских. Величины показателей выражали в условных единицах. Полученные результаты анализа крови лабораторных животных в указанном режиме показали, что полихлорированные бифенилы вызывают окислительный стресс. В табл. 1 приведены показатели хемилюминесценции плазмы крови крыс трех исследуемых групп на третьи сутки эксперимента.

минесценции достоверно изменились по сравнению с контрольной (табл. 1). Спонтанная светимость, отражающая скорость расходования свободных радикалов, окисляющих преимущественно субстраты липидной природы, увеличилась в 2,1 раза по сравнению с нормой (группа 1). Амплитуда быстрой вспышки, характеризующая содержание гидроперекисей в пробе, увеличилась в 1,3 раза, а латентный период, определяющий окисление липидов в зависимости от содержания антиоксидантов, ожидаемо понизился в 1,3 раза. Интенсивность свободнорадикального окисления по характеру медленной вспышки во второй группе животных возросла на третьи сутки приблизительно в 2 раза, а величина светосуммы (S Fe^{2}), показывающая склонность антиоксидантной системы к развитию цепных процессов окисления, увеличилась в 1,6 раза по сравнению с контрольной. Таким образом, вводимый препарат «Совол» по данным хемилюминесценции достоверно активирует процессы свободнорадикального типа и провоцирует нарастание окислительного стресса физиологических систем лабораторных животных.

Гуминовые кислоты, введенные животным третьей группы, существенно влияют на параметры хемилюминесценции (табл. 1). Значения величин светосуммы

Таблица 1

Показатели хемилюминесценции плазмы крови лабораторных животных на третьи сутки эксперимента

Показатели хемилюминесценции	*h*	H Fe^{2+}	S Fe^{2+}	Sp	*R*
1 группа (контрольная)	3,09 ± 0,50	2,01 ± 0,10	7,14 ± 0,80	1,93 ± 0,50	1,54 ± 0,10
2 группа (сравнение)	4,00 ± 0,30 p < 0,46	3,99 ± 0,10	11,45 ± 0,10 p < 0,0013	3,99 ± 0,49 p < 0,0400	1,16 ± 0,10 p < 0,052
3 группа (лечение ГК)	2,99 ± 0,1 p < 0,0330	2,82 ± 0,1 p < 0,0003	7,89 ± 0,1 p < 0,0001	1,46 ± 0,12 p < 0,0017	2,13 ± 0,10 p < 0,0007

Как видно из приведенных данных, показатели хемилюминесценции плазмы крови у здоровых крыс (1 группа) на третьи сутки эксперимента составили: светосумма – 7,14 усл. ед., спонтанная светимость– 1,93 усл. ед., интенсивность амплитуды быстрой вспышки – 3,09 и амплитуда медленной вспышки– 2,01 усл. ед.

Добавление полихлорированных бифенилов значительно активизирует процессы свободнорадикального окисления. У животных второй группы показатели хемилю-

пришли практически к норме и составили 7,89 усл. ед., что свидетельствует об увеличении толерантности животных к протеканию свободнорадикальных реакций. Величина спонтанной светимости уменьшилась в 2 раза по сравнению с группой сравнения, составив 1,46 усл. ед., что ниже аналогичного значения показателей контрольной группы животных на 25%. Очевидно, что гуминовые кислоты за счет взаимодействия с оксидантами обеспечивают необходимый уровень защиты веществ липоидного

характера. Симбатно уменьшились показатели быстрой и медленной вспышки в 1,3 и 1,4 раза соответственно по отношению ко второй группе животных; при этом показатель быстрой вспышки отвечал значению нормы. Латентный период составил 2,13 усл. ед, что превышает не только данный показатель группы сравнения, но и на 28 % увеличивает время начала свечения в контрольной группе (табл. 1). Данный факт достоверно доказывает детоксицирующее действие гуминовых кислот пелоидов.

В табл. 2 приведены показатели хемилюминесценции плазмы животных на десятые сутки эксперимента. Как видно из полученных результатов, в группе сравнения амплитуда быстрой вспышки, максимальная светимость, светосумма и спонтанная светимость больше в 1,95; 1,23; 1,25 и 1,44 раза соответственно по отношению к контрольной группе животных.

Значения величин быстрой вспышки и латентного периода составляют 3,07 и 1,98 усл. ед. соответственно, что близко к показателям физиологической нормы. Следует отметить, что полученные данные светосуммы и спонтанной светимости имеют значения ниже аналогичных величин плазмы животных контрольной группы. Это связано, по-видимому, с тем, что гуминовые кислоты включаются в редокс-буферные системы крови и достоверно понижают процессы свободнорадикального окисления, усиливая иммунологический статуса организма животных.

Таким образом, экспериментально установлено детоксицирующее действие гуминовых кислот пелоидов, которые нивелируют свободнорадикальные процессы, повышая резистентность систем крови в модели окислительного стресса.

Следует отметить, что действие гуминовых кислот пелоидов как антиоксидантов имеет универсальный характер и комплексно влияет на окислительные реакции различного типа. Гуминовые кислоты низкоминерализованных иловых сульфидных пелоидов представляют значительный интерес с позиций создания антиоксидантных лекарственных препаратов природного происхождения.

Таблица 2

Показатели хемилюминесценции плазмы крови лабораторных животных на десятые сутки эксперимента

Показатели хемилюминесценции	*h*	H Fe^{2+}	S Fe^{2+}	Sp	*R*
1 группа (контрольная)	3,10 ± 0,50	2,05 ± 0,10	7,20 ± 0,80	1,88 ± 0,50	1,62 ± 0,10
2 группа (сравнение)	6,03 ± 0,40 p < 0,46	2,52 ± 0,03 p < 0,0001	9,01 ± 0,16 p < 0,0013	2,70 ± 0,20 p < 0,0400	1,44 ± 0,10 p < 0,052
3 группа (лечение ГК)	3,07 ± 0,1 p < 0,0007	2,05 ± 0,1 p < 0,00246	5,91 ± 0,1 p < 0,0001	1,39 ± 0,12 p < 0,00119	1,98 ± 0,2 p < 0,00841

Сравнение параметров хемилюминесценции плазмы животных второй группы на третьи и десятые сутки показывает некоторое уменьшение значений максимальной и спонтанной светимости, а также светосуммы. Очевидно, что на 10 сутки антиоксидантные системы крови в организме животных группы сравнения несколько понижают процессы свободнорадикального окисления. Однако существенное увеличение (в 1,5 раза) значения быстрой вспышки свидетельствует о значительной активности окислительных реакций.

В третье группе экспериментальных животных окислительно-восстановительный статуса плазмы под действием гуминовых кислот пелоидов восстанавливается, наблюдается понижение показателей хемилюминесценции (табл. 2).

На основании экспериментальных данных можно сделать следующие выводы:

1. Воздействие полихлорированных бифенилов вызывает окислительный стресс, который достигает своего максимума на третьи сутки.

2. Гуминовые кислоты пелоидов обладают выраженным детоксицирующим действием, достоверно понижая окислительный стресс и приводя окислительно-восстановительный статус организма лабораторных животных в физиологическую норму.

Список литературы

1. Аввакумова Н.П., Герчиков А.Я., Хайруллина В.Р., Жданова А.В. Антиоксидантные свойства гуминовых веществ пелоидов //Химико-фармацевтический журнал. – 2011. – Т. 45. – № 3. – С. 50–51.

2. Зенков Н.К. Окислительный стресс: Биохимический и патофизиологический аспекты / Н.К. Зенков, В.З. Ланкин, Е.Б. Меньщикова. – М.: Наука / Интерпериодика, 2011. – 343 с.

3. Костюк В.А. Биорадикалы и биоантиоксиданты / В.А. Костюк, А.И. Потапович. – Минск: БГУ, 2004. – 174 с.

4. Куркин В.А., Куркина А.В., Авдеева Е.В. Флавоноиды как биологически активные соединения лекарственных растений // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 11–9. – С. 1897–1901.

5. Меньщикова, Е.Б. Окислительный стресс при воспалении / Е.Б. Меньщикова, Н.К. Зенков // Успехи соврем. биологии. – 1997. – Т. 17. – С. 155–171.

6. Bacterial lipopolysaccharide-induced oxidative stress in the impairment of steroidogenesis and spermatogenesis in rats / M.M. Reddy, S.V. Mahipal, J. Subhashini et al. // Reprod. Toxicol. – 2006. – Vol. 22. – P. 493–500.

7. Bioaccumulation and Distribution of PCBs in Hens and Chickens / D.B. Feshin et al. // Organohal. Compounds. 2005. – P. 1498–1501.

8. Chronic pelvic pain syndrome/chronic prostatitis affect the acrosome reaction in human spermatozoa / R. Henkel, M. Ludwig, H.C. Schuppe et al. // World J. Urol. – 2006. – Vol. 24. – P. 39–44.

9. DNA damage in human sperm is related to urinary levels of phthalate monoester and oxidative metabolites / R. Hauser, J.D. Meeker, N.P. Singh et al. // Hum. Reprod. – 2007. – Vol. 22. – P. 688–695.

10. Kostyukevich Y., Kononikhin A., Nikolaev E., Popov I., Zherebker A., Perminova I. Enumeration of non-labile oxygen atoms in dissolved organic matter by use of 16o/18o exchange and fourier transform ion-cyclotron resonance mass spectrometry // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2014. – Т. 406. – № 26. – С. 6655–6664.