

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ім.О.В.Палладіна

на правах рукопису

СНОЗ Сергій Валентинович

**ДОСЛІДЖЕННЯ ЦИТОХРОМІВ P-450, ЩО
ПЕРЕТВОРЮЮТЬ N-НІТРОЗОСПОЛУКИ,
В ЛІМФОЦИТАХ ТА ПЕЧІНЦІ ЩУРІВ В
УМОВАХ ВПЛИВУ ЕКЗОГЕННИХ ТА ЕН-
ДОГЕННИХ ФАКТОРІВ НІТРОЗУВАННЯ**

03.00.04 - БІОХІМІЯ

А в т о р е ф е р а т

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ-1995

ДВ 33.655

Робота виконана в Інституті Здоров'я імені Л.І.Медведя МОЗ України.

НАУКОВИЙ КЕРІВНИК

доктор біологічних наук,
старший науковий
співробітник
М.П.Дмитренко

ОФІЦІЙНІ ОПОНЕНТИ:

доктор медичних наук,
старший науковий
співробітник
Є.О.Баглій
кандидат біологічних наук,
старший науковий
співробітник
В.О.Михайловський

Провідна установа: Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Захист дисертації відбудеться "25" грудня 1995 р. о 14 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 01.84.01 в Інституті біохімії імені О.В.Палладіна НАН України за адресою: 252601, Київ, вул. Леонтовича 9.

З дисертацією можна ознайомитись у науковій бібліотеці інституту.

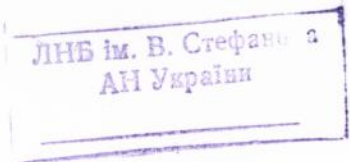
ЛНБ України ім.В.Стефаніка



00754986 (\$)

Автореферат розісланий

"25" листопада 1995 р.



Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
кандидат біологічних наук

Кірсенко

О.В.Кірсенко

Актуальність проблеми. Утворення, біотрансформація та виведення з організму N-нітросполук привертає увагу дослідників вже на протязі чотирьох десятиків років з моменту появи перших доказів канцерогенних та мутагенних властивостей цих речовин.

В останній час інтерес до цієї проблеми значно виріс. Це обумовлено накопиченням в оточуючому середовищі попередників N-нітросполук, що пов'язано з широким використанням в сільському господарстві пестицидів, які вміщують вторинні та третинні аміногрупи, в тому числі і сим-триазинових гербіцидів, надходженням в ґрунт і до рослин значних кількостей нітритів та нітратів у вигляді мінеральних добрив, комунальних стічних вод і атмосферного забруднення оксидами азоту (Rubenchik V.L., 1993). До того ж, з'явилися дані про те, що в організмі ссавців відбувається утворення оксиду азоту, який, можливо, є одним з основних ендогенних факторів нітרוзування (Moncada S., 1991). Його синтез макрофагами та іншими типами клітин значно посилюється у відповідь на надходження мікроорганізмів. Активовані таким чином макрофаги спроможні утворювати N-нітросполуки з відповідних амінів (Miwa M., 1987; Kosaka H., 1989).

Біотрансформацію N-нітросполук, а також більшості ксенобіотиків в організмі виконує монооксигеназна система. Основним її компонентом є гемопротеїд - цитохром P-450, представлений багатьма ізоформами, які мають різну субстратну специфічність та індукуються різними класами ксенобіотиків (Мишин В.М., Ляхович В.В., 1985). Особлива форма цитохрому P-450 (P-450 PE1) каталізує N-деметилування та денітרוзування N-нітросполук (Yang C.S., 1990).

Враховуючи вищевказані властивості цитохромів P-450, вивчення особливостей їх каталітичних активностей та фізико-хімічного стану необхідне для оцінки ступеню навантаження на організм і небезпеки відповідних ксенобіотиків.

Цитохроми P-450 найбільш детально вивчені в печінці, де вони біотрансформують основну масу ксенобіотиків, що надходять до організму. Разом з тим, все більше даних вказують на те, що цитохроми P-450, які розміщені в клітинах імунної системи, відіграють не менш важливу роль у цьому процесі, зокрема в біоактивації ароматичних та поліароматичних вуглеводнів, і в пов'язаним з нею розвитком патології крові, імунодефіцитів і онкозахворювань (Schnier G.G., 1989; Осташевский В.А., 1987).

Вищевказані факти визначають актуальність проблеми та дозволяють сформулювати мету роботи.

Мета роботи: Вивчити стан цитохромів P-450, що трансформують N-нітросполуки, в лімфоцитах різних лімфоїдних органів і крові та в тканині печінки в умовах дії сим-триазинового гербіциду симазину, нітриту натрію, індукції ендogenousного синтезу оксиду азоту, а також відомих модуляторів активності монооксигеназної системи.

Для досягнення поставленої мети вирішувались такі завдання:

1. Вивчити основні кінетичні характеристики реакцій N-деметилування та денітрозування N-нітрозодиметиламіну (НДМА) в лімфоцитах різного субпопуляційного складу (тимус, селезінка, периферійна кров) та вплив на ці реакції індукторів та інгібіторів різних ізоформ цитохрому P-450.

2. Дослідити комбіновану та ізольовану дію симазину та нітриту натрію на активність перетворення цитохромами P-450 НДМА в лімфоцитах та печінці в гострому і субхронічному досліді.

3. Визначити можливість нітрузування симазину в різних органах щурів (печінка, тимус, селезінка, нирки) та дослідити вплив на цей процес екзогенних та ендogenousних попередників N-нітросполук.

4. Провести статистичний аналіз можливих кореляційних залежностей між каталітичними активностями цитохромів P-450 у печінці та лімфоцитах різних органів.

Наукова новизна та теоретична значимість роботи. Вперше проведено порівняльне дослідження денітрозуючої і N-деметилуючої активностей цитохромів P-450 та їх основних кінетичних характеристик по відношенню до НДМА в лімфоцитах з різних органів та в тканині печінки щурів. Вивчено вплив на ці ферментативні активності попередників N-нітросполук (симазину та нітриту натрію) при їх роздільному і сумісному введенні, відомих індукторів та інгібіторів монооксигеназної системи і вакцини БЦЖ, яка викликає прискорення ендogenousного синтезу NO в організмі. Показана можливість утворення N-нітрососимазину в різних органах щурів та досліджено вплив на цей процес нітриту натрію та ін'єкції вакцини БЦЖ.

Практична значимість роботи. Отримані результати і, зокрема, співвідношення швидкостей реакцій N-деметилування та денітрозування можуть бути використані при оцінці небезпеки сполук, здатних нітрузуватись, та нітритів, нітратів і індукторів ендogenousного синтезу оксиду азоту.

Виявлена позитивна кореляція між змінами активностей вказаних реакцій у печінці та лімфоцитах периферійної крові є основою для розробки оціночних тестів хімічного “навантаження” організму людини N-нітрозосполуками та їх попередниками, з використанням загальної фракції лімфоцитів периферійної крові.

Отримані дані вказують на необхідність обмеження допуску осіб з хронічними запалювальними процесами інфекційної, аутоімунної та іншої етіології до роботи з азотвміщуючими хімічними сполуками, здатними нітрузуватись.

Особистий внесок автора у розробку наукових результатів, що виносяться на захист, полягає у виконанні всього обсягу експериментальної частини дисертації, підборі та обробці літературних даних, а також, разом з науковим керівником, аналізі та інтерпретації отриманих результатів. Розділ роботи по вивченню нітрузування симазину виконаний при допомозі к.м.н.Бардіка Ю.В.

Положення, які виносяться на захист.

1.Лімфоцити з різних лімфоїдних органів і периферійної крові можуть перетворювати N-нітрозосполуки подібно по характеру дії та активності тканині печінки.

2.З сим-триазинових гербіцидів в організмі можуть утворюватись N-нітрозосполуки і цей процес посилюється під впливом екзогенних та ендогенних нітрузуючих агентів.

3.Екзогенні та ендогенні попередники N-нітрозосполук здатні впливати на їх цитохром P-450-залежну біотрансформацію в тканині печінки і в лімфоцитах з різних лімфоїдних органів та крові.

Апробація роботи. Основні результати роботи були представлені на VI Українському біохімічному з'їзді (Київ,1992), XII Міжнародному симпозиумі під егідою ВОЗ “Здоров'я та ергономічні аспекти безпечного використання хімічних речовин у сільському та лісовому господарстві”(Київ,1993), Міжнародній конференції “Навколишнє середовище та здоров'я” (Чернівці, 1993) та конференції присвяченій 100-річчю з дня народження акад. О.І.Черкеса (Київ,1994).

Публікації. Матеріали дисертації викладені в 10 наукових працях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація викладена на 135 сторінках друкованого тексту і складається з вступу, огляду літератури, об'єктів та методів досліджень, результатів власних досліджень та їх обговорення, заключення, висновків та переліку використаних джерел з 204 найменувань. Ілюстративний матеріал поданий в 11 малюнках та 15 таблицях.

ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.

В дослідях були використані щури-самці лінії Вістар вагою 100-200 г, що утримувались на стандартній дієті віварію. Об'єктом досліджень служили кров, тимус, селезінка, печінка та нирки дослідних тварин.

Досліджувалась дія таких сполук:

- симазину (2-хлор-4,6-біс(етиламіно)-сим-триазин, LD_{50} для щурів складає 1390 мг/кг маси тіла), як пестициду, що здатний нітрозуватись в умовах *in vitro*. Вплив симазину на активності цитохромів P-450 щурів оцінювався в гострому та субхронічному (два місяці) дослідях як при роздільному, так і при сумісному введенні разом з $NaNO_2$. Були використані слідуєчі дози пестициду: 278 та 139 мг/кг маси тіла тварин, відповідно, при роздільному і сумісному введенні у гострому досліді та 139 і 70 мг/кг, відповідно, у субхронічному досліді. Симазин у вигляді водної суспензії вводили тваринам щоденно за допомогою внутрішньошлункового зонду;

- нітриту натрію (LD_{50} для щурів складає 120 мг/кг маси тіла), як нітрозуючого агенту, при сумісному та роздільному введенні у гострому досліді у дозах 12 і 24 мг/кг маси тіла та у субхронічному - 6 і 12 мг/кг, відповідно. $NaNO_2$ вводили щоденно внутрішньошлунково у вигляді водного розчину;

- вакцини БЦЖ, як фактору, що викликає індукцію ендогенного синтезу NO та активацію перитонеальних макрофагів в дозі 10 мг/кг маси тіла тварин. Вакцину БЦЖ вводили інтраперитонеально у вигляді стерильного розчину в 0.9% NaCl.

Постмітохондріальну фракцію печінки одержували за методом Haugen D.A. і Coon M.S. (1983) шляхом диференційного центрифугування в 1.15% KCl. Лімфоцити та перитонеальні макрофаги виділяли як описано у Дж. Клауса (1990) за стандартними методами.

Культивування перитонеальних макрофагів проводили в середовищі Хенкса, забуференому 10 ммоль/л трис HCl, з 5% сироваткою теляти і 2 ммоль/л L-аргініном в CO_2 -інкубаторі при 37 °C на протязі 24 годин. Культивування закінчували внесенням насиченого розчину $Ba(OH)_2$ та 20% розчину $ZnSO_4$ та подальшим центрифугуванням. Відбирали супернатант та використовували його для визначення нітритів та нітратів.

Визначення N-деметилуючої та денітрозуючої активностей цитохромів P-450 у печінці та лімфоцитах проводили з використанням НДМА як субстрату за методом Tu Y.Y and Yang Ch.S. (1983) та Yoo J. (1987) з модифікаціями. Ферментативні актив-

ності визначали по утворенню продуктів реакцій - формальдегіду (спектрофотометрично за допомогою реактиву Nash) та нітритіону (за допомогою реактиву Гріса).

Визначення нітритів та нітратів виконували за методом Green L. (1982), з модифікаціями. Визначення проводили в 96-луночному планшеті, спектрофотометрично за допомогою реактиву Гріса. Для визначення кількості нітратів проби пропускали через кадмієві колонки (відновна здатність $97.2 \pm 8.4\%$). Отриманий при відновленні нітрит визначали, як описано вище. Розрахунки проводили за калібрувальною кривою з врахуванням коефіцієнту відновлення.

При вивченні нітродування симазину тварини були розділені на чотири групи. Всім їм вводили внутрішньошлунково ^{14}C -симазин (питома радіоактивність 1,7 ГБк/г) з розрахунку 2.3 мг/кг маси тіла. Перша група була контрольною, друга - разом з ^{14}C -симазином отримувала внутрішньошлунково NaNO_2 (20.5 мг/кг маси тіла). Третій групі за 18 годин до експерименту вводили інтраперитоніально вакцину БЦЖ в дозі 10 мг/кг маси тіла. Четвертій групі тварин вводили вакцину БЦЖ, NaNO_2 та ^{14}C -симазин, як вказано вище. Забій проводили при ефірному наркозі через 30 хвилин після введення симазину та NaNO_2 . Виділені органи одразу ж заморожували в рідкому азоті. N-нітрососимазин та симазин екстрагували хлороформом з лужних гомогенатів тканин. Проби розділяли за допомогою тонкошарової хроматографії на платівках Silufol 4V-257. Розділення проводили в системі ефір:гексан (1:2), послідовним хроматографуванням, двічі. Симазин та N-нітрососимазин визначали на пластинках при ультрафіолетовому опроміненні у вигляді темних плям різної локалізації (R_f симазину-0.15, N-нітрососимазину-0.50). Виділені плями вирізали та поміщали у флакони із сцинтиляційною рідиною ЖС106А. Про синтез N-нітрососимазину судили по включенню радіоактивної мітки в його плями на хроматограмі.

Білок визначали за методом Лоурі (1951).

Статистичну обробку результатів досліджень проводили методами варіаційної статистики з використанням t-критерію Стьюдента. Розрахунок кореляції виконували за методикою обчислення коефіцієнтів кореляції для малочисельних груп (Плохинский Н.А., 1970). Зміни вважали достовірними відносно відповідного контролю при $p < 0.05$, в таблицях позначено "*".

РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.

1. Дослідження кінетичних характеристик реакцій N-деметилування та денітрозування в лімфоцитах. В лімфоцитах тимусу, селезінки та периферійної крові нами виявлені цитохром P-450-залежні N-деметилуючі та денітрозуючі активності відносно такого субстрату як N-нітрозодиметиламін. Оскільки константи Міхаеліса і максимальні швидкості та оптимальні концетрації субстрату для цих реакцій в досліджуваних лімфоцитах у літературі не описані, нами були проведені відповідні дослідження. При цьому встановлено, що K_m реакції N-деметилування N-нітрозодиметиламіну у лімфоцитах селезінки та периферійної крові складають, відповідно, 37.1 і 44.6 мМ, що значно більше величини K_m вказаної реакції в тканині печінки, яка становить, по даним різних авторів, від 1.3 до 10 мМ (Yang C.S., 1990; Chieli E., 1990). В тимоцитах величина константи Міхаеліса приблизно така ж як у печінці - 10.6 мМ. V_{max} реакції N-деметилування у всіх досліджених лімфоцитах знаходиться в межах 1.3-2.5 нмоль/хв, що менше ніж у печінці, де за даними Chieli E. (1990) V_{max} становить 6.8 нмоль/хв. K_m реакції денітрозування в лімфоцитах селезінки (32.5 мМ), периферійної крові (63.5 мМ) та тимусу (32.7 мМ) також значно більші, ніж величина, відома для печінки, яка по даним різних авторів складає 5.6-8.0 мМ (Yang C.S., 1990; Chieli E., 1990). Максимальна швидкість реакції денітрозування в лімфоцитах периферійної крові (2.35 нмоль/хв) в три рази більша, ніж в лімфоцитах тимусу і селезінки, де ці величини приблизно однакові і становлять 0.72 і 0.90 нмоль/хв, відповідно.

З даних літератури відомо, що етанол викликає індукцію ізоформи P-450 ПЕ1 в печінці, гліцерин пригнічує реакції N-деметилування та денітрозування, пов'язані з цією ізоформою в умовах *in vitro* в концентраціях 22-220 мМ (Yoo J., 1987). Нами виявлено, що етанол викликає в лімфоцитах тимусу та периферійної крові збільшення денітрозуючої активності в 3-4 рази, як і в печінці. В лімфоцитах селезінки індукція не спостерігається, що, можливо, пояснюється особливостями субпопуляційного складу цього органу.

Фенобарбітал не виявив свого впливу на денітрозуючу активність ні в одному з досліджуваних органів. N-деметилуюча активність в усіх досліджуваних лімфоцитах і печінці не індукувалась як фенобарбіталом, так і етанолом, за винятком тимоцитів, де останній збільшував активність в 1.7 рази.

Вивчення впливу гліцерину в концентраціях 22-220 мМ на вказані реакції показало, що він пригнічує реакцію денітрозування в спленоцитах тільки на 10%, в лімфоцитах тимусу і периферійної крові до 30%, а для тканини печінки процент пригнічення складав 45%, що відповідає даним літератури (Yoo J., 1987). Реакція N-деметилування слабо пригнічується в спленоцитах та лімфоцитах периферійної крові (процент пригнічення досягає 12 при 100-220 мМ гліцерину), і не змінюється в тимоцитах. В тканині печінки інгібуюча дія гліцерину на N-деметилуючу активність була більш виражена і складала 30-35%.

Виходячи з результатів дослідів по гальмуванню гліцерином та індукції етанолом і фенобарбіталом реакцій денітрозування та N-деметилування, можна припустити, що в лімфоїдних органах, лімфоцитах крові та в тканині печінки за біотрансформацію N-нітрозодиметиламіну може відповідати одна і та ж ізоформа цитохрому P-450, а саме P-450 ІІЕ1.

2. Дослідження ізольованої та комбінованої дії симазину і нітриту натрію на N-деметилуючу та денітрозуючу активності печінки та лімфоцитів тварин у гострому досліді. Нами виявлено, що при роздільному і сумісному введенні досліджуваних речовин щурам на протязі трьох днів активність N-деметилування N-нітрозодиметиламіну в печінці знижується приблизно у 5 разів (таблиця 1). Зниження цієї активності у лімфоцитах селезінки дещо менше (2.5-3 рази), а у лімфоцитах тимусу і периферійної крові спостерігалось її підвищення. При сумісному введенні симазину та нітриту натрію в усіх досліджуваних випадках ефект виявився менш ніж адитивним.

Вплив симазину та нітриту натрію на активність N-деметилування в печінці та лімфоцитах селезінки, тимусу і периферійної крові щурів у гострому досліді (нмоль НСНО на мг білку/хв; $M \pm m$; $n=6-7$)

Речовина	Печінка	Лімфоцити		
		селезінки	тимусу	крові
контроль	0.43±0.16	0.99±0.16	0.29±0.14	0.68±0.17
симазин	0.08±0.02*	0.40±0.09*	1.50±0.37*	1.74±0.38*
NaNO ₂	0.09±0.02*	0.31±0.08*	2.16±0.40*	2.37±0.57*
симазин+ NaNO ₂	0.09±0.02*	0.34±0.07*	2.52±0.46*	2.16±0.40*

Симазин не впливав на активність денітрозування у печінці, але збільшував її в лімфоцитах селезінки (в 4.2 рази), тимусу (в 2.9 рази) та периферійної крові (в 2.5 рази). Нітрит натрію стимулював дану активність як у лімфоцитах, так і в печінці. Ці зміни можуть бути пов'язані з посиленням синтезу N-нітросполук в організмі або з активацією гуанілатциклази, що приводить у обох випадках до індукції цитохрому P-450 ІІЕ1. Сумісне введення симазину та нітриту натрію викликало менш ніж адитивний ефект на денітрозуючу активність в усіх випадках. Так, у печінці зміни були на рівні ефекту, викликаного лише одним нітритом натрію, у селезінці ефект був менший, ніж при дії симазину, але більший, ніж при введенні нітриту натрію. У тимусі ефект був більшим від викликаного і симазином і нітритом натрію, але не досягав сумарного. У лімфоцитах крові досліджувана активність виявилась на рівні контрольних величин (таблиця 2).

Таблиця 2

Вплив симазину та нітриту натрію на активність денітрозування в печінці та лімфоцитах селезінки, тимусу і периферійної крові щурів у гострому досліді (нмоль NO_2^- на мг білку/хв; $M \pm m$; $n=6-7$)

Речовина	Печінка	Лімфоцити		
		селезінки	тимусу	крові
контроль	0.24 ± 0.06	0.68 ± 0.12	0.59 ± 0.07	0.98 ± 0.29
симазин	0.38 ± 0.07	$2.83 \pm 0.68^*$	$1.71 \pm 0.31^*$	$2.42 \pm 0.54^*$
NaNO_2	$0.64 \pm 0.17^*$	$1.60 \pm 0.30^*$	$2.66 \pm 0.65^*$	$2.92 \pm 0.63^*$
симазин+ NaNO_2	$0.67 \pm 0.14^*$	$2.19 \pm 0.41^*$	$3.27 \pm 0.83^*$	$1.63 \pm 0.46^*$

При сумісному і роздільному введенні симазину та нітриту натрію величини співвідношення активностей реакцій N-деметилування та денітрозування ($\text{HCHO}/\text{NO}_2^-$ індекс) у печінці знижується на порядок. За думкою ряду авторів величина цього показнику має критеріальне значення при оцінці можливої мутагенної та канцерогенної дії N-нітросполук (Цырлов И.Б., 1987; Suzuki H., 1991; Момот В.Я., Мельников О.Р., 1990). Його величина звичайно близька до одиниці і залежить від виду та віку тварин. До зміни величини $\text{HCHO}/\text{NO}_2^-$ індексу може приводити надходження до організму як N-нітросполук, так і ксенобіотиків інших класів.

На сьогоднішній день немає однозначності в трактуванні цих змін. Більшість дослідників (Yang C.S., 1990; Suzuki H., 1991; Момот В.Я., Мельников О.Р., 1990) схиляються до того, що зрос-

тання індексу є небезпечним, тому що приводить до зростання продукції метильних радикалів, які безпосередньо метилюють нуклеотиди ДНК, до утворення формальдегіду та до активації таких канцерогенів, як N-нітросоаміни і N-нітросоаміди. Але поряд з цим існує і інша думка (Цырлов И.Б., 1987): інтенсивна генерація нітрит-іонів також являє собою значну небезпеку, в тому числі і для геному, поскільки нітрит викликає одониткові розриви та знижує рівень репарації ДНК (Михайленко В.М., 1988). На наш погляд, небезпечним є різке відхилення цього показнику в той чи інший бік за рамки фізіологічних норм.

3. Дослідження впливу симазину та нітриту натрію на ферментативні активності цитохромів P-450 у субхронічному досліді. Із одержаних даних (таблиця 3) випливає, що введення щурам симазину на протязі двох тижнів збільшувало активність N-деметилування в тимоцитах, знижувало в лімфоцитах селезінки і майже не впливало на неї в тканині печінки. Нітрит натрію також підвищував N-деметилуючу активність тимоцитів, не впливав на неї в лімфоцитах селезінки і зменшував у тканині печінки.

Денітрозуюча активність в печінці при введенні на протязі двох тижнів нітриту натрію зростає, величина співвідношення N-деметилуючої та денітрозуючої активностей знижується з 2.31 до 0.34 (таблиця 4). Симазин при даному терміні введення збільшував денітрозуючу активність печінки. Сумісне ж введення досліджуваних речовин також підвищувало активність N-деметилування та денітрозування N-нітрозодиметиламіну в печінці, знижуючи $\text{НСНО}/\text{NO}_2$ індекс, хоча і в меншій мірі, ніж при надходженні одного NaNO_2 . В лімфоцитах тимусу в тих же умовах спостерігалось підвищення N-деметилуючої активності, але нижче сумарної дії досліджуваних речовин. Слабкий гальмуючий вплив симазину та NaNO_2 на N-деметилування у селезінці при сумісному введенні потенціювався.

Таблиця 3

Вплив симазину та нітриту натрію на активність
N-деметилування в печінці і лімфоцитах селезінки
та тимусу щурів у суб-хронічному досліді
(нмоль НСНО на мг білку/хв; $M \pm m$; $n=6-7$)

Речовина	Термін введення	Печінка	Лімфоцити	
			тимусу	селезінки
контроль	два тижні	0.39 ± 0.07	0.31 ± 0.03	0.99 ± 0.21
NaNO_2	-//-	$0.14 \pm 0.05^*$	$0.75 \pm 0.19^*$	0.76 ± 0.18
симазин	-//-	0.59 ± 0.09	$1.21 \pm 0.37^*$	0.71 ± 0.31
симазин+ NaNO_2	-//-	$1.05 \pm 0.25^*$	$1.01 \pm 0.25^*$	$0.37 \pm 0.11^*$
контроль	два місяці	0.49 ± 0.18	0.61 ± 0.21	2.35 ± 0.72
NaNO_2	-//-	$0.05 \pm 0.03^*$	0.50 ± 0.12	$0.69 \pm 0.22^*$
симазин	-//-	0.94 ± 0.26	1.06 ± 0.25	$0.24 \pm 0.07^*$
симазин+ NaNO_2	-//-	$1.28 \pm 0.26^*$	$1.89 \pm 0.52^*$	1.96 ± 1.24

При двохмісячному надходженні симазину до організму щурів спостерігалась така ж сама направленість його дії на активність деметилювання в усіх досліджених органах, як і в двохтижневому досліді. Лише в лімфоцитах селезінки пригнічення цієї активності настільки посилювалось, що вона зменшилась у порівнянні

з відповідною контрольною величиною в десять разів. Денітрозуюча активність тканини печінки під впливом симазину за цей же час знизилась, а $\text{HCHO}/\text{NO}_2^-$ індекс зріс в 3.7 рази.

Таблиця 4

Вплив симазину та нітриту натрію на денітрозуючу активність і $\text{HCHO}/\text{NO}_2^-$ індекс в печінці щурів в субхронічному досліді

Речовина	Термін введення	Індекс $M \pm m, n=6-7$	Активність, нмоль NO_2^- на мг білку за хв, $M \pm m, n=6-7$
контроль	два тижні	2.31 ± 0.16	0.17 ± 0.02
NaNO_2	-/-	$0.34 \pm 0.06^*$	$0.40 \pm 0.08^*$
симазин	-/-	2.59 ± 0.06	$0.27 \pm 0.03^*$
симазин+ NaNO_2	-/-	1.73 ± 0.28	$0.60 \pm 0.07^*$
контроль	два місяці	0.84 ± 0.23	0.67 ± 0.09
NaNO_2	-/-	1.34 ± 1.14	$0.04 \pm 0.01^*$
симазин	-/-	$3.13 \pm 0.09^*$	$0.30 \pm 0.08^*$
симазин+ NaNO_2	-/-	$1.39 \pm 0.02^*$	0.92 ± 0.18

При введенні нітриту натрію на протязі двох місяців N-деметилуюча активність в печінці і селезінці знизилась ще більше, ніж за два тижні, а в тимусі була на рівні контрольних величин. Збільшення денітрозуючої та N-деметилуючої активностей в тканині печінки при сумісному введенні нітриту натрію та симазину на протязі двох місяців перевищувало сумарний ефект їх дії, відповідно, у 1.46 та 3 рази. Таким чином, одержані результати свід-

чать на користь того, що симазин та нітрит натрію самі по собі викликають суттєві зміни цитохром Р-450-залежних N-деметилуючої та денітрозуючої активностей, характер яких визначається різними і взаємоперетинаючимися шляхами впливу на відповідні ферменти у лімфоцитах різного субпопуляційного складу та у тканині печінки. Цей вплив може відбуватись на кількох рівнях: геномному (експресія чи репресія генів, пошкодження структури ДНК), трансляційному і посттрансляційному (вплив на білкову та простетичну структуру ферменту, ліпідне оточення, субстрати, продукти та кофактори відповідних реакцій).

Вплив симазину на цитохроми Р-450 у першу чергу пов'язаний з його біотрансформацією в клітинах, яка відбувається у два етапи. На першому, проходить цитохром Р-450-залежне N-деалкилювання, яке приводить до утворення етильних радикалів та ацетальдегіду, на другому - кон'югація з глутатіоном та виведення з організму (Adams N.H., 1990). Крім того, симазин є слабким мутагеном (внаслідок подібності своєї структури до структури піримідинових нуклеотидів він здатний інтеркалюватись в спіраль ДНК) та імунотоксикантом, особливо для Т-лімфоцитів (Маковская Е.И., 1990).

При сумісному надходженні до організму симазину і нітриту натрію крім введених речовин діють ще новоутворений N-нітросимазин та їх метаболіти. Можливо тому нами не спостерігалось сумарної дії симазину та нітриту натрію при їх сумісному введенні, в більшості випадків відбувалось потенціювання або взаємокомпенсація ефектів.

4. Вплив вакцини БЦЖ, як індуктора ендogenous синтезу оксиду азоту, на активності реакцій цитохром Р-450-залежно N-деметилування та денітрозування. Враховуючи те, що монооксигеназна та імунна системи утворюють загальний механізм захисту організму від екзогенних впливів біологічної та хімічної природи (Ковалев І.Е., 1985; Williams J., 1985), ми дослідили зміни у активностях реакцій N-деметилування та денітрозування у лімфоцитах селезінки, периферійної крові та у тканині печінки при імунній відповіді організму на ін'єкцію вакцини БЦЖ.

Імунізація тварин вакциною БЦЖ викликала активацію перитоніальних макрофагів, про що свідчило збільшення в 2.6 рази загальної кількості клітин у перитоніальному ексудаті (з 2.3 ± 0.06 до $(5.91 \pm 0.21) \times 10^7$ клітин), підвищення їх здатності відновлювати нітросиній тетразолій та утворювати нітрит- та нітрат-іони.

Таблиця 5

Вплив вакцини БЦЖ на N-деметилуючу і денітрозуючу активності печінки, лімфоцитів селезінки та периферійної крові щурів (нмоль НСНО або NO_2^- на мг білку/хв; $M \pm m$; $n=6-8$)

Умови дослідю	Реакція	Печінка	Лімфоцити	
			селезінки	крові
контроль	N-деметилювання	0.43 ± 0.16	0.99 ± 0.16	0.69 ± 0.17
БЦЖ		$0.12 \pm 0.07^*$	0.66 ± 0.18	0.74 ± 0.36
контроль	денітрозування	0.24 ± 0.06	0.68 ± 0.12	0.98 ± 0.29
БЦЖ		$0.04 \pm 0.01^*$	$1.45 \pm 0.46^*$	2.83 ± 1.71

Встановлено, що ін'єкція тваринам БЦЖ гальмує в 3.5 рази N-деметилуючу і в 5.6 рази денітрозуючу активності в печінці. Змін N-деметилуючої активності в лімфоцитах селезінки та периферійної крові при цьому не виявлено. В лімфоцитах селезінки денітрозуюча активність під впливом вакцини БЦЖ зросла у 2.5 рази.

Згідно даних літератури (Сибиряк С.В., 1992), пригнічення мікросомальних ферментів печінки, зокрема монооксигеназ, спостерігається при введенні імуностимуляторів і опосередковується через активацію макрофагів та посиленням ними синтезу розчинних факторів, таких як інтерферон, інтерлейкін-1, фактору нез'ясованої дії. Отримані нами дані дають можливість припустити, що пригнічення мікросомальних ферментів, відповідальних за перетворення N-нітросоамінів, пов'язане з дією на гемовий центр цитохрому P-450 ПЕ1 оксиду азоту, що синтезується у відповідь на введення вакцини БЦЖ макрофагами, гепатоцитами та іншими типами клітин. Можливо тому, імунізація організму щурів вакциною БЦЖ приводить до пригнічення активності біотрансформації N-нітродиметиламіну в тканині печінки і, одночасно, до

збільшення денітрозуючої активності в лімфоцитах селезінки. Різна спрямованість цих ефектів, мабуть, пояснюється тим, що в печінці оксид азоту безпосередньо пригнічує відповідну ізоформу цитохрому P-450, а в лімфоцитах переважає її індукція N-нітросполуками, що утворюються в цих умовах з ендогенних амінів і оксиду азоту.

5. Аналіз кореляційних залежностей між активностями цитохромів P-450 у печінці та лімфоцитах різних органів. Найбільш доступним джерелом лімфоцитів людини є периферійна кров. Показана можливість оцінювати схильність людини до онкозахворювань по активності локалізованих в цих клітинах цитохромів P-450, що перетворюють бензо[а]пірен (Осташевський В.А., 1987). Для прогнозування розвитку та перебігу захворювань, обумовлених впливом ксенобіотиків, зокрема N-нітросполук та їх попередників, необхідно визначити чи відповідають зміни активностей відповідних ферментів у лімфоцитах тим змінам, що відбуваються в печінці. Для цього проведено аналіз кореляції між вивченими у нашій роботі активностями цитохромів P-450 у печінці та лімфоцитах різних лімфоїдних органів та периферійної крові. Проаналізувавши всі випадки виявленої кореляції при введенні до організму щурів симазину, нітриту натрію, етанолу, фенобарбіталу, вакцини БЦЖ, ми виявили, що позитивна кореляція між активностями N-деметилування у печінці та лімфоцитах спостерігається у 15% (селезінка); 23% (тимус); 60% (кров) випадків, в той же час негативна - у 8%; 17% та 20%, відповідно. Для денітрозування виявлена позитивна кореляція у 28% (селезінка); 20% (тимус); 60% (кров) випадків та негативна - 25%; 8%; 40%, відповідно.

Підсумовуючи, слід відмітити, що найбільше випадків позитивної кореляції між змінами активностей N-деметилування та денітрозування N-нітродиметиламіну виявлено у печінці та у лімфоцитах периферійної крові (60% позитивної кореляції для обох активностей).

6. Вивчення нітрозування симазину в організмі щурів. Введення щурам ^{14}C -симазину викликало утворення в усіх досліджених органах слідових кількостей міченого N-нітрососимазину (таблиця 6). Джерелами азоту для нітрозування симазину в даному випадку можуть бути ендогенні NO_2^- , NO_3^- , NO та реакції транснітрозування, а кількість N-нітрососимазину відображає співвідношення процесів нітрозування/денітрозування в організмі.

Введення NaNO_2 приводило до збільшення кількості N-нітросимазину в печінці та тимусі, відповідно, в 2.8 рази і 3.1 рази. В селезінці і нирках відмічалась тенденція до збільшення вмісту N-нітросимазину (таблиця 6).

Інтраперитоніальна ін'єкція вакцини БЦЖ за 18 годин до введення симазину привела до зростання кількості N-нітросимазину в печінці (в 4.4 рази більше в порівнянні з контролем) та в нирках (у 3 рази). В тимусі та селезінці направленість змін рівня N-нітросимазину така ж, але вони статистично недостовірні. Згідно з даними літератури (Knowles R.G., 1990), ін'єкції мікроорганізмів тваринам приводять до суттєвого збільшення синтезу оксиду азоту в різних тканинах і клітинах вже через кілька годин після введення. Отримані результати вказують на те, що оксид азоту також може бути нітрозуючим фактором для симазину в тканинах щурів.

Таблиця 6

Вплив NaNO_2 та вакцини БЦЖ на кількість ^{14}C -N-нітросимазину в органах (імпульсів/хв на грам сирової маси, $M \pm m$; $n=12-18$)

Речовина	Нирки	Печінка	Селезінка	Тимус
контроль	592±104	436±115	751±137	618±188
NaNO_2	898±335	1135±232*	1424±475	1908±292*
БЦЖ	1708±338*	1922±643*	1297±352	1030±289
БЦЖ+ NaNO_2	1084±239*	656±326	2730±1700*	3773±1736*

При сумісному введенні симазину і нітриту натрію на фоні ін'єкції вакцини БЦЖ спостерігались неоднозначні зміни вмісту N-нітросимазину в тканинах різних органів. Так, в селезінці та тимусі кількість цієї речовини зростає в 3.6 і 6.1 рази відносно контрольних величин. Зовсім інша картина - в нирках та печінці: кількість N-нітросимазину відносно контрольної величини суттєво не змінилась. Відсутність в усіх випадках сумарного ефекту

протиричить уяві про те, що N-нітрососимазин при введенні тваринам нітриту натрію і симазину синтезується тільки в шлунку та має особливий шлях транспорту, біотрансформації і виведення в порівнянні з тією ж сполукою, але синтезованою безпосередньо в тканинах з участю оксиду азоту. Більш ймовірно, що нітрит натрію і вакцина БЦЖ впливають на вміст N-нітрососимазину в тканинах взаємозалежно через ряд факторів. Наприклад, змінюючи токсикодинаміку симазину і N-нітрососимазину через вплив на серцево-судинну та видільну системи організму, що відображається на кількості N-нітрососимазину в тих чи інших тканинах. Різна направленість сумісної дії нітриту натрію і БЦЖ в печінці та нирках з одного боку, та в тимусі і селезінці - з іншого, можливо, також пов'язана з тканинною специфічністю ферментів, які денітрозують N-нітрососполуки, та NO-синтаз, їх субклітинною локалізацією, здатністю до індукції та чутливістю до різних активаторів і інгібіторів.

Таким чином, отримані дані свідчать про те, що фактором утворення небезпечних N-нітрососполук з речовин, які забруднюють навколишнє середовище або потрапляють до організму у вигляді ліків та містять вторинні чи третинні аміногрупи, можуть бути не тільки екзогенні, але й ендогенні нітрити, нітрати та оксид азоту. Небезпека останніх посилюється тим, що утворення N-нітрососполук проходить на фоні імунної відповіді організму та запалювальних процесів, які потребують фармакологічного втручання.

7. Дослідження денітрозування N-нітрососимазину в печінці та лімфоцитах щурів. Поскільки нами було виявлено, що N-нітрососимазин присутній в різних органах щурів, постало питання, яким чином він біотрансформується в них і чи приймає участь в цьому процесі монооксигеназна система.

Отримані результати свідчать про те, що N-нітрососимазин денітрозується як в печінці, так і в лімфоцитах тимусу, селезінки та периферійної крові, причому K_m цієї реакції у всіх органах відрізняється не більш як на 50% і складає 5 мМ у печінці; 6.7 мМ в тимусі та по 7.7 мМ у лімфоцитах селезінки і периферійної крові. Це свідчить про приблизно однакову субстратну спорідненість до N-нітрососимазину ферментів, що метаболізують його в цих органах. Щодо V_{max} , навпаки, виявлені розбіжності величин. Якщо у тканині печінки вона складає 0.13 нмоль NO_2^- за хвилину, то в тимоцитах - 0.5 нмоль/хв, в спленоцитах - 1.43 нмоль/хв і в крові - 1.1 нмоль/хв. Дослідження впливу гліцерину на швидкість реакції денітрозування N-нітрососимазину показав

ло, що біотрансформація цієї сполуки в печінці в значній мірі пов'язана з цитохромом Р-450 ПЕ1 (процент пригнічення вихідної активності досягає 50). В лімфоцитах пригнічення в два-три рази менше (20% в крові та по 15% в тимусі та селезінці).

ВИСНОВКИ

1. В лімфоцитах тимусу, селезінки та периферійної крові виявлені реакції N-деметилювання та денітрозування НДМА. Визначені величини K_m і V_{max} цих реакцій.

2. В гострому досліді показано, що симазин та нітрит натрію як при роздільному, так і при сумісному введенні пригнічують активність N-деметилювання в печінці та лімфоцитах селезінки, збільшують її в лімфоцитах тимусу та периферійної крові і підвищують денітрозуючу активність в усіх органах. При сумісному введенні симазину та нітриту натрію ефект відносно обох активностей був менш ніж адитивний. Під впливом досліджуваних речовин в печінці значно зменшилось співвідношення швидкостей реакцій N-деметилювання та денітрозування.

3. В субхронічному експерименті виявлено, що дія симазину та нітриту натрію на досліджувані активності перетворення НДМА за умов роздільного введення має різноспрямований характер, а при спільному введенні ефект перевищує сумарний. Величина співвідношення швидкостей реакцій N-деметилювання та денітрозування в печінці при комбінованій дії симазину і нітриту натрію збільшилась, що вказує на зростання мутагенної та канцерогенної небезпеки при сумісному використанні цих речовин.

4. Інтраперитоніальна ін'єкція тваринам вакцини БЦЖ викликає пригнічення досліджуваних активностей в печінці та збільшує денітрозуючу активність в лімфоцитах селезінки. При цьому спостерігається активація перитонеальних макрофагів та індукція в них синтезу оксиду азоту.

5. Вивчення нітрозування симазину в умовах *in vivo* виявило, що нітрит натрію збільшує вміст N-нітрососимазину в тимусі та печінці, а вакцина БЦЖ в нирках і печінці.

6. Виявлено, що N-нітрососимазин денітрозується як в печінці, так і в лімфоцитах. Ця реакція має близькі для всіх органів величини K_m , різні V_{max} та інгібується гліцерином.

7. Отримана позитивна кореляція між активностями реакцій N-деметилювання та денітрозування N-нітрососполук у печінці та лімфоцитах периферійної крові свідчить про певну схожість реагування лімфоцитарної та печінкової монооксигеназних систем на досліджені в роботі сполуки.

ПЕРЕЛІК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ.

1. Сноз С.В., Дмитренко Н.П. N-деметиліруюча і денітрозуюча активність печини і лімфоцитів тимуса і селезенки крыс при впливі симазина і нітрита натрія// Укр.біохім. журнал.-1993.-65, N4.- с.94-98.
2. Дмитренко Н.П., Іваницький В.А., Варич В.Я., Сноз С.В. Изучение комбинированного действия диоксида азота и нитрита натрия на организм крысы// ДАН Украины.-1993. - N11.- с.162-165.
3. Сова Р.Е., Дмитренко Н.П., Медведев В.И., Сноз С.В. Токсикология диоксинов. Оценка опасности. Сообщение I. Токсичность и иммунотоксичность полихлорированных дибензодиоксинов и дибензофуранов// Токсикологический вестник.-1994. N1- с.7-12.
4. Snoz S. and Dmitrenko N. Evaluation of the hazard from the combined effect of triazine herbicides and sodium nitrite using cytochromes P-450 // Proceedings of the XII Joint CIGR, IAAMRH, IURFRO Intern. Symp. (Kiev, 8-11 June 1993), Kiev.-1994.-p.201-204.
5. Дмитренко Н.П., Бардик Ю.В., Сноз С.В. Изучение нитрозирования симазина у крыс// ДАН Украины.-1995.-N11.
6. Дмитренко М.П., Варич В.Я., Сноз С.В. Утворення NO в тканинах щурів різного віку в умовах дії симазину і етанолу // Тез.доп. VI Укр.біохім. з'їзду, Київ,1992.-ч.I-с.166.
7. Snoz S.V., Dmitrenko N.P. The possible evaluation of the hazard of combined effect of the triazine's herbicides and NaNO_2 using cytochromes P-450// XII Intern. Symp. "Health and ergonomic aspects of safe use chemicals in agricultural and forestry" (Kiev, 8-11 June 1993):Abstr.-Kiev.-1993.-p.52.
8. Сноз С.В., Дмитренко М.П. Вивчення залежності між активностями цитохрому P-450 печінки та лімфоцитів щурів в умовах дії індукторів монооксигеназної системи// Тез.доп. Міжн.наук. конф. (Чернівці, листопад 1993 р.) Чернівці.-1993.-с.51.
9. Сноз С.В. Вивчення впливу БЦЖ на активність цитохром P-450-залежного N-деметилування та денітрозування у щурів // Тез. доп. Наукової конф.присвяченій 100-річчю з дня народження акад. Черкеса О.І.(Київ, травень 1994 р.)- Київ.-1994.-с.39
10. Snoz S., Dmitrenko N. Activity of the rat cytochrome P-450 system in conditions of the induction immunity and nitric oxide synthesis// Toxicol.Lett.-1995.-78,Supl.1.-p.75.

А Н О Т А Ц І Ї

Сноз С.В. Исследования цитохромов Р-450, преобразующих N-нитрозосоединения, в лимфоцитах и печени крыс в условиях влияния экзогенных и эндогенных факторов нитрозирования. Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 - биохимия, Институт биохимии им. А.В.Палладина НАН Украины, Киев, 1995.

Впервые проведено сравнительное исследование влияния экзогенных (симазин и нитрит натрия) и эндогенных (индуцированный вакциной БЦЖ синтез оксида азота) факторов нитрозирования на цитохром Р-450-зависимые активности N-деметиляции и денитрозирования N-нитрозосоединений в ткани печени и лимфоцитах тимуса, селезенки и периферической крови крыс. Показано, что процесс нитрозирования симазина в тканях крыс стимулируют как экзогенные источники азота, так и эндогенный синтез его оксида (NO) в организме. Проведенные исследования являются основанием для создания новых методических подходов по оценке опасности способных нитрозироваться соединений.

Snoz S.V. Study of the N-nitrosocompounds transformed cytochromes P-450 in the rat lymphocytes and liver under the effects of the exogenic and endogenic nitroization factors. Thesis for seeking of scientific degree of candidate of biological sciences on speciality 03.00.04 - biochemistry, Institute of biochemistry, Kyiv, 1995.

Effects of the exogenic (simazine and sodium nitrite) and endogenic (BCG vaccine-induced nitric oxide synthesis) nitroization factors on the cytochrome P-450-associated N-demethylation and denitroization activities in the rat liver and tymus, spleen and blood lymphocytes was studied. It was shown, simazine nitroization in rat tissues was stimulated by exogenic nitrogen resources and endogenic NO synthesis in the organism. These investigations are the base for creation of new methods for evaluation of the N-nitrosocompounds and its predecessors hazard.

Ключові слова: цитохроми Р-450, лімфоцити, N-нітрозосполуки, нитрозування.



Здано в набір 14.11.95 р. Підписано до друку 14.11.95 р.
Тираж 100 примірників
Надруковано в Інституті здоров'я ім. Л.І.Медведя
252127, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 6

452902

АВ 33.633

А II

Сана С.В. Исследования по механизму Р-450 трансформации N-нитрозосоединения в клеточных и печеночных эритроцитах и тканях печени крысы в условиях введения экзогенных и эндогенных факторов ингибирования. Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Институт биохимии им. Д.В.Григоренко НАН Украины, Киев, 1995.

Впервые проведено комплексное исследование влияния экзогенных (симилян и нитрит натрия) и эндогенных (метилглюксиминный аналог) ИЦЖ систем оксида азота на ферментативную активность цитохрома Р-450-зависимых реакций N-метилглюксимина и деэтильирования N-нитрозосоединений в тканях печени и эритроцитах крысы, симиляна и периферической крови крысы. Показано, что при введении нитрозосоединения симиляна в ткани крысы стимулируется как экзогенные источники азота, так и эндогенный синтез его оксида (NO) в организме. Проведенные исследования являются основанием для создания новых методических подходов по оценке окислительных способностей нитрозосоединений.

Sana S.V. Study of the N-nitroso compounds transformed cytochrome P-450 in the rat lymphocytes and liver under the effects of the exogenous and endogenous nitrosation factors. Thesis for seeking of scientific degree of candidate of biological sciences on speciality 03.00.04 - biochemistry, Institute of biochemistry, Kiev, 1995.

Effects of the exogenous (similans and sodium nitrite) and endogenous (NO synthase-derived nitric oxide) nitrosation factors on the cytochrome P-450 dependent N-methylglucosamine and deethylating activities in the rat liver and peripheral blood of lymphocytes was studied. It was shown, however, similan and nitrite caused an increase in cytochrome P-450 dependent N-methylglucosamine and deethylating activities in the rat liver and peripheral blood. These investigations are the base for creation of new methods for evaluation of the N-nitroso compounds and its

Кандидат биологических наук Сана С.В.
Институт биохимии им. Д.В.Григоренко НАН Украины,
Киев, 1995 г.