



УДК 615.099.08:546.289

М. М. Бабенко, І. Й. Сейфулліна, В. М. Ткаченко

## ВИВЧЕННЯ МОЖЛИВИХ ШЛЯХІВ ДЕТОКСИКАЦІЇ ПРИ ГОСТРОМУ ОТРУЄННІ ДІНІТРООРТОКРЕЗОЛОМ І ЗАСТОСУВАННІ КООРДИНАЦІЙНОЇ СПОЛУКИ ГЕРМАНІЮ З НІКОТИНАМІДОМ

Луганський державний медичний університет,  
Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова

Патологія хімічної етіології посідає важливе місце в структурі захворюваності, що визначає пріоритетність проблем сучасної фармакології та токсикології у пошуку і розробці високоефективних і безпечних засобів медикаментозної профілактики та лікування гострих і хронічних отруєнь.

Серед органічних сполук, що найбільш широко використовуються у різних галузях промисловості та сільському господарстві, особливе місце посідають алкільні похідні 2,4-динітрофенолу, зокрема динітроортокрезол (ДНОК), який є дуже високотоксичним і небезпечним щодо виникнення інтоксикацій в умовах його промислового синтезу і застосування як пестицидного препарату. Досі відсутні високоефективні засоби фармакокорекції отруєнь ДНОК, промисловий випуск якого в Україні здійснюється на Рубежанському ВАТ «Краситель».

Проведені нами раніше скринінгові дослідження показали, що на моделі гострої (ЛД<sub>50</sub>) пероральної ДНОК-інтоксикації найбільш виражений антидотно-лікувальний ефект здійснює комплексна сполука германію з нікотинамідом (МІГУ-2) в умовах його внутрішньочеревинного введення.

Центральною ланкою токсикокінетики ксенобіотиків є їх зворотне комплексоутворення з транспортними білками, параметри якого дозволяють дуже коректно оцінювати характер і ступінь вираженості токсичних властивостей ксенобіотика і тривалості їх реалізації, що, у

свою чергу, свідчить про стан процесів природної детоксикації отрути на етапі її біотранспорту [1; 2].

**Мета** даної роботи — вивчити вплив координаційної сполуки германію з нікотинамідом як потенційного антидотно-лікувального засобу при ДНОК-інтоксикації на стан процесів зворотного комплексоутворення сироваткових білків із цим токсикантом.

### Матеріали та методи дослідження

Дослідження виконувалися на білих безпородних щурах масою 180–220 г, що утримувалися на стандартному раціоні в умовах віварію Луганського державного медичного університету.

Гостру пероральну ДНОК-інтоксикацію моделювали шляхом одноразового внутрішньошлункового введення щурам 1%-го водного розчину натрієвої солі ДНОК (х. ч.) дозою, що відповідає ЛД<sub>50</sub>. Внутрішньочеревинно тваринам вводили МІГУ-2 у вигляді 1%-го водного розчину в раніше розробленому нами дозовому режимі: 87,34 мг/кг за 48 хв до початку отруєння та 112,87 мг/кг через 5 хв після нього.

Зв'язувальну здатність сироваткових білків з ДНОК вивчали методом рівноважного діалізу за допомогою апарата С. Чьоггера в модифікації [3]. Кількісні параметри зворотної взаємодії — константу асоціації ( $K_{ac}$ ) комплексу «білок — ліганд» і кількість місць зв'язування (N) визначали в динаміці: через 3, 6 і 24 год від моменту надходження отрути в організм відпо-



відно до методичних рекомендацій ДФЦ МОЗ України [4].

Концентрацію ДНОК у діалізаті великих комірок діалізного апарату визначали спектрофотометрично [5], а МІГУ-2 — екстракційно-фотометричним методом [6] за допомогою СФ-46А.

Для доведення оборотності процесів комплексоутворення ДНОК із сироватковими білками використовували відповідність отриманих в експерименті значень вільних фракцій отрути у великих комірках досліджуваних і контрольних камер діалізного апарату закону діючих мас, тобто можливості їх лінеаризації в координатах Скетчарда [4].

Розрахунок величин  $K_{ac}$  і  $N$  проводили за допомогою розробленої в середовищі Turbo Pascal v.7.0 спеціальної комп'ютерної програми [7].

### Результати дослідження та їх обговорення

На підставі отриманих в експерименті даних щодо визначення величин, зв'язаних із протеїнами ( $C_B$ ) і вільних ( $C_T$ ) фракцій ДНОК побудовані і представлені на рисунку ізотерми його взаємодії з транспортними білками інтактних щурів і при застосуванні МІГУ-2 (за усередненими даними, отриманими у різні терміни після введення цієї сполуки). Як видно з рисунка, білки сироватки крові тварин, яким вводили потенційний антидотно-лікувальний засіб, зв'язують ДНОК значно активніше порівняно з протеїнами тварин інтактною серією.

Результати дослідження можна пояснити тим, що під впливом МІГУ-2 конформація білкових молекул зазнає низки змін, внаслідок яких відбувається збільшення кількості центрів, що зв'язують ДНОК. При цьому не можна виключити і те, що збільшення зв'язувальної ємності сироваткових білків відбувається одночасно з підвищенням їх афінитету до отрути.

Враховуючи дані літератури з розглянутого питання [8; 9], необхідно конкретизувати, що основним транспортним білком, який обумовлює зворотне комплексоутворення ДНОК, є сироватковий альбумін.

З метою підтвердження висловленої тези про здатність МІГУ-2 модифікувати комплексоутворювальну активність сироваткового альбуміну у відношенні ДНОК, доцільно одержати більш розширені відомості про характер зворотного комплексоутворення отрути з транспортними білками шляхом визначення величин кількісних показників, які характеризують цей процес —  $K_{ac}$  і  $N$ . Отримані при цьому дані подано в таблиці.

Встановлено, що ступінь спорідненості ДНОК до сироваткового альбуміну на фоні введення МІГУ-2 вищий порівняно з інтактною серією і пропорційний часу після надходження потенційного антидоту в організм тварин. При

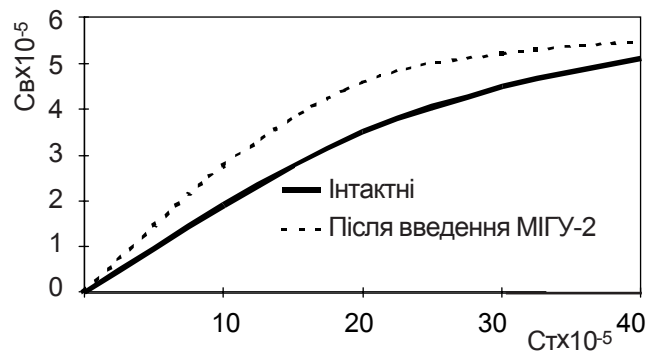


Рисунок. Ізотерми зв'язування ДНОК з білками сироватки крові інтактних щурів і через 3, 6 і 24 год (за усередненими даними) після введення МІГУ-2: Св — концентрація зв'язаної фракції ДНОК; Ст — концентрація вільної фракції ДНОК.

Таблиця  
Кількісні показники зворотного зв'язування ДНОК з білками сироватки крові на фоні застосування МІГУ-2

Час дослідження після введення МІГУ-2, год	$K_{ac}$ , моль <sup>-1</sup> ·х10 <sup>6</sup>	$N$
3	1,39	9
6	2,15	9
24	3,32	13
Інтактні	1,24	8

цьому слід зазначити збільшення афінитету білків до отрути, що реєструється через 6 і 24 год після застосування МІГУ-2 у 1,73 і 2,68 рази відповідно, що варто розцінювати як істотний внесок цієї координаційної сполуки у формування комплексоутворювальної активності транспортних білків відносно ДНОК.

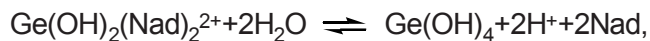
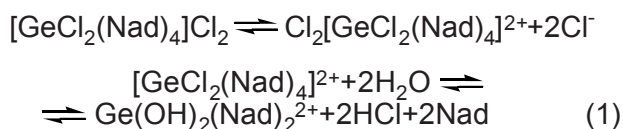
Не менш цікаві дані отримані й при визначенні кількості місць фіксації ДНОК на молекулі білка під впливом МІГУ-2 (див. таблицю). Встановлено, що в умовах експерименту зв'язуюча ємність альбуміну на фоні введення МІГУ-2 збільшується порівняно з інтактною серією, особливо через 24 год (на 62,5 %) від моменту надходження препарату в організм.

Таким чином, на моделі гострої ДНОК-інтоксикації доведено здатність досліджуваної координаційної сполуки германію з нікотинамідом модифікувати комплексоутворювальну активність транспортних білків (альбуміну) шляхом збільшення константи асоціації комплексу «білок — ліганд» і кількості місць фіксації на молекулі протеїну, що варто розглядати як одну зі складових механізму посилення природного шляху детоксикації ксенобіотиків препаратом, який містить германій, на етапі біотранспорту.

З метою розуміння можливих механізмів взаємовідношень досліджуваної отрути та її потенційного антидоту проведено окрему серію фізико-хімічних досліджень, теоретичним обґрунтуванням яких є те, що кислотний харак-



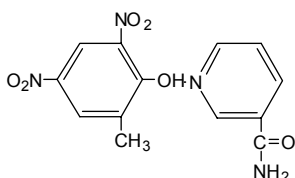
тер використовуваного 1%-го водного розчину МІГУ-2 (рН=3) свідчить про здатність до дисоціації та часткового гідролізу комплексу. Ці процеси відбуваються ступінчасто:



де Ge — германій; Nad — нікотинамід.

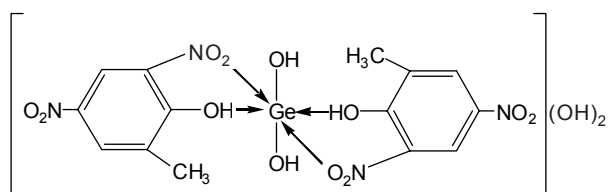
З огляду на те, що однією з основних буферних систем крові є бікарбонат натрію — вугільна кислота, у роботі був використаний буферний розчин на основі натрію бікарбонату (рН=7,4), що відповідає 0,01056 моль/л, у 100 мол якого розчиняли МІГУ-2 при мольному співвідношенні до  $\text{NaHCO}_3 = 1:4$ . При розчиненні МІГУ-2 у цій буферній системі рН розчину становила 5,05, що свідчить про часткову нейтралізацію натрію бікарбонатом одного з продуктів гідролізу МІГУ-2 —  $\text{HCl}$ , створюючи при цьому умови для виявлення основних властивостей нікотинамідом, що виділяється.

В умовах експерименту в шлунку щурів (рН=1,5–4), що були отруєні ДНОК і отримували лікування МІГУ-2, з урахуванням хімічних перетворень (1), створюються такі мольні співвідношення ДНОК : Ge : Nad = 1:1:4. Експериментально доведено високу розчинність ДНОК у розчині нікотинамідом, яку можна пояснити утворенням досить міцної онієвої сполуки:



З огляду на це, більш реальною є реакція взаємодії ДНОК з нікотинамідом, що виділяється з МІГУ-2, ніж реакція з просторово утрудненим катіоном  $\text{HAD}^+$ . Останній розглядається як одна з точок прикладання токсичної дії ДНОК у механізмі роз'єднання ним окисного фосфорування.

З іншого боку, дослідження показали, що внаслідок наявності в германію координаційного числа, що дорівнює 6, можлива його взаємодія з ДНОК і утворення при цьому комплексної сполуки такої хімічної будови:



Є всі підстави вважати, що утворена комплексна сполука (Ge+ДНОК) може розглядатися як продукт знешкодження ДНОК, а отже і як один зі шляхів детоксикації організму в умовах гострого отруєння цим ксенобіотиком.

Таким чином, результати проведеної серії досліджень дозволяють зробити висновок, що МІГУ-2 реалізує свої лікувально-профілактичні властивості при гострій пероральній ДНОК-інтоксикації за допомогою збільшення афінитету транспортних білків до отрути, що значною мірою знижує реалізацію токсичної дії отрути на організм. У той же час МІГУ-2 в організмі є доброю транспортною системою для нікотинамідом і германію, що взаємодіють із ДНОК, утворюючи хімічні сполуки, токсичність яких набагато менша, ніж у вихідної отрути. При цьому водорозчинна форма продуктів реакції, що утворюються, імовірно за все, також сприяє виведенню ДНОК із організму.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Луйк А. И., Лукьянчук В. Д. Сывороточный альбумин и биотранспорт ядов. — М.: Медицина, 1984. — 224 с.
2. Лукьянчук В. Д. Молекулярные основы механизма токсического действия и разработка принципов детоксикации динитрофенольных соединений: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — К., 1988. — 42 с.
3. Методичні рекомендації по вивченню зв'язування лікарських засобів з білками сироватки крові / О. І. Луйк, В. Д. Лук'яничук, Д. С. Кравець та ін. — К.; Луганськ, 1999. — 21 с.
4. Експериментальне вивчення взаємодії лікарських засобів із сироватковим альбуміном: Метод. рекомендації / В. Д. Лук'яничук, Д. С. Кравець, Д. М. Болгов та ін. — К.: ДФЦ МОЗ України, 2004. — 31 с.
5. Лукьянчук В. Д., Кравець Д. С. Метод определения динитроортокрезола в органах и тканях // Современ. пробл. токсикологии. — 1999. — № 4. — С. 39-40.
6. Кресюн В. Й., Відавська А. Г., Шемонаєва К. Ф. Екстракційно-фотометричне визначення мікрокількостей германію у тканинах експериментальних тварин // Одес. мед. журн. — 2000. — № 6 (62). — С. 7-11.
7. Кравець Д. С. Оптимизация методических приемов расчета параметров хемобиокинетики с помощью прикладных программ для ЭВМ // Укр. мед. альманах. — 2000. — Т. 3, № 1. — С. 90-92.
8. Лукьянчук В. Д. Молекулярные механизмы взаимодействия сывороточного альбумина с динитроортокрезолом // Вопр. мед. химии. — 1983. — № 2. — С. 8-12.
9. Луйк А. И., Лукьянчук В. Д. Параметры взаимодействия нитрофенолов различного химического строения с альбумином и их токсичность // Там же. — 1982. — № 3. — С. 48-50.

