

ТОКСИКОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

**ОЦЕНКА БИОХИМИЧЕСКОГО СТАТУСА БЕЛЫХ КРЫС
ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ГЕКСИЛОВОГО ЭФИРА 5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ
КИСЛОТЫ В СУБХРОНИЧЕСКОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ****Е.К. ВЛАСЕНКО, С.И. СЫЧИК, В.А. СТЕЛЬМАХ, И.И. ИЛЮКОВА, В.А. ГРЫНЧАК**

Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр гигиены», г.Минск, Республика Беларусь

Вестник ВГМУ. – 2015. – Том 14, №6. – С. 104-111.

**THE EVALUATION OF WHITE RATS' BIOCHEMICAL STATUS ON THE IMPACT
OF 5-AMINOLEVULINIC ACID HEXYL ESTER IN SUBCHRONIC EXPERIMENT****E.K. VLASENKO, S.I. SYCHIK, V.A. STELMAKH, I.I. ILYUKOVA, V.A. GRYNCHAK**

Republican Unitary Enterprise «Practical-Scientific Centre of Hygiene», Minsk, Republic of Belarus

Vestnik VGMU. 2015;14(6):104-111.

Резюме.

В субхроническом эксперименте изучены биохимические параметры состояния организма белых крыс, получавших перорально действующее вещество нового регулятора роста растений - гексилловый эфир 5-аминолевулиновой кислоты. В условиях тридцатидневного эксперимента препарат демонстрировал выраженные дозозависимые эффекты проявления кумулятивных свойств на уровне летальных исходов. Так, за время опыта не отмечено гибели подопытных животных в контроле и группах, получавших препарат в дозах 440 и 110 мг/кг. Введение препарата в дозе 880 мг/кг (кратной 1/10 от DL_{50ac}) привело к единичному случаю гибели, а при введении дозы 1760 мг/кг (кратной 1/5 от DL_{50ac}) наблюдали гибель 7 из 10 особей. На 30-е сутки эксперимента у крыс изучен ряд лабораторных показателей сыворотки крови и мочи. Интрагастральное введение препарата белым крысам приводило к изменению ряда лабораторных биохимических показателей функционирования печени, что отражалось в увеличении активностей аланинаминотрансферазы и гамма-глутамилтранспептидазы, снижении величины коэффициента де Ритиса, также наблюдалось дозозависимое повышение уровня билирубина. У животных, получавших препарат в максимально переносимой дозе 440 мг/кг изучали функциональное состояние монооксигеназ печени. Введение препарата приводило к увеличению в 1,4 раза удельного содержания цитохрома P450 с аналогичным в 1,5 раза увеличением удельной активности P450-редуктазы в сравнении с контрольными значениями. При этом в печени подопытных животных наблюдается накопление цитохрома P420. В результате изучения каталитической активности цитохрома P450 оказалось, что препарат не приводит к изменению V_{max} и K_m в реакциях O-деалкилирования 7-этоксикумарина и 7-этоксирезорифина, следовательно, не влияет на детоксикационную функцию печени. В целом, изменение биохимических показателей (в т.ч. характеризующих состояние монооксигеназной системы) у подопытных животных, получавших изучаемое соединение в субхроническом эксперименте, может свидетельствовать о мембраноповреждающем действии препарата.

Ключевые слова: гексилловый эфир 5-аминолевулиновой кислоты, токсичность, субхроническая токсичность, цитохром P450.

Abstract.

Biochemical parameters of white rats' status were studied in subchronic experiment during which they received perorally an active substance of the new plant growth regulator - 5-aminolevulinic acid hexyl ester. In the context of the thirty-days' experiment the drug showed marked dose-dependent effects of cumulative properties manifestation at the level of lethal outcomes. Thus, during the experiment at the doses of 440 and 110 mg/kg no death of the experimental animals and in the control groups was observed. The introduction of the drug at the dose of 880 mg/kg (1/10 of DL_{50ac}) led to the death of one animal, and at the dose of 1760 mg/kg (1/5 of DL_{50ac}) resulted in the

death of 7 rats out of 10. On the 30th day of the experiment several laboratory parameters of blood serum and urine were studied in rats. Intra-gastric administration of the drug to white rats led to the change in a number of laboratory biochemical parameters of the liver function, which was reflected in an increase of the activity of alanine aminotransferase and gamma glutamyltranspeptidase, reduction of de Rytis coefficient, a dose-dependent increase in the level of bilirubin was also observed. In the animals treated with the drug at the maximally tolerated dose of 440 mg/kg functional state of the liver monooxygenases was studied. The introduction of the drug led to the 1,4-fold increase of the specific content of cytochrome P450 with the similar 1,5-fold increase in the specific activity of the P450-reductase when compared to control values. In the liver of experimental animals the accumulation of cytochrome P420 was observed. As a result of studying the catalytic activity of cytochrome P450, the drug turned out not to change the V_{max} and K_m in reactions of O-dealkylation of 7-ethoxycumarine and 7-ethoxyresorufine therefore it does not affect the detoxification function of the liver. In general, changes in biochemical parameters (including those characterizing the state of monooxygenase system) in experimental animals treated with the studied substance in the subchronic experiment may indicate membrane damaging effects of the drug.

Key words: 5-aminolevulinic acid hexyl ester, toxicity, subchronic toxicity, cytochrome P450.

В результате разработки защитно-стимулирующих составов для обработки семян агрокультур в Институте биоорганической химии НАН Беларуси создан перспективный регулятор роста растений – гексиловый эфир 5-аминолевулиновой кислоты (ГЭ-АЛК), обладающий выраженными ростостимулирующими свойствами в отношении ряда сельскохозяйственных растений. В соответствии с требованиями национального законодательства ГЭ-АЛК как новый пестицид подлежит обязательной токсикологической оценке с обоснованием гигиенических регламентов в объектах среды обитания человека. Необходимым этапом таких исследований является субхронический эксперимент на теплокровных животных, который, наряду с иными показателями токсикометрии, дает представление о степени потенциальной опасности изучаемого вещества для организма и имеет существенное значение для организации профилактики возможных отравлений.

Целью данного исследования является изучение биохимических показателей белых крыс, подвергнутых повторному внутрижелудочному воздействию ГЭ-АЛК включая оценку функционального состояния микросомальных монооксигеназ печени.

Материал и методы

Согласно результатам ранее проведенных исследований ГЭ-АЛК является умеренно опасным химическим соединением (III класс опасности), в условиях однократного интрагастрального введения самкам и самцам белых

мышей и крыс клиническая картина интоксикации, параметры токсичности и потенциальной опасности острого отравления не демонстрируют гендерных и видовых различий. В связи с этим изучение ряда показателей биохимического статуса организма лабораторных животных в субхроническом эксперименте по внутрижелудочному введению фиксированных доз ГЭ-АЛК (метод Ю.С. Кагана и В.В. Станкевича [1]) проводили в течение 30 суток на самцах белых крыс. Животные разделены на 5 групп по 10 особей в каждой: I-контрольную и II, III, IV, V-опытные, подвергавшиеся воздействию 1/5, 1/10, 1/20 и 1/80 от DL_{50ac} (1760, 880, 440 и 110 мг/кг ГЭ-АЛК, соответственно). Препарат в водном растворе вводили в желудок подопытных животных с помощью иглы-зонда. Контрольной группе вводили дистиллированную воду в эквивалентных объемах. По окончании 30-суточного эксперимента у животных изучали ряд морфофункциональных показателей, собирали мочу, декапитировали и в сыворотке крови и моче исследовали 30 показателей ферментативной активности, иммунологического статуса и содержания биогенных метаболитов при помощи автоматического биохимического анализатора Accent 200 (Cormay, Польша) с использованием стандартных наборов реагентов к данному прибору фирмы Cormay.

В качестве модели изучения биохимических характеристик детоксикационной функции использовали микросомальную фракцию, выделенную из клеток печени крыс, получавших максимально переносимую дозу 440 мг/кг ГЭ-АЛК (кратная 1/20 от DL_{50ac}). Микросо-

мальную фракцию выделяли с помощью дифференциального центрифугирования согласно методике Т.А. van der Hoeven и М.Ж. Coon [2]. Содержание цитохромов P450 и P420 определяли разностной фотометрией восстановленного дитионитом карбонильного комплекса по методике, предложенной Т. Omura [3]. Концентрацию общего белка измеряли по методу Лоури в модификации для мембранных белков [4] с использованием бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта. За активностью цитохром P450-редуктазы следили по реакции восстановления цитохрома *c*, описанной J.L. Vermilion и М.Ж. Coon [5]. Определение каталитической активности цитохрома P450 по отношению к 7-этоксикумарину проводили по методу А. Aitio [6], по отношению к 7-этоксирезорурфину - по методу М.Д. Burke [7].

При анализе полученных данных был использован однофакторный дисперсионный анализ с применением поправки Бонферрони. Количественные параметры представлены в виде среднего значения (М) и 95% доверительного интервала ($\pm 95\%$ ДИ). Критическим уровнем значимости при проверке статистических гипотез был принят $p \leq 0,05$.

Обращение с животными при подготовке и проведении экспериментов осуществляли в соответствии с основными этическими принципами надлежащей лабораторной практики [8].

Результаты и обсуждение

За время эксперимента не отмечено гибели подопытных животных в контроле и группах, получавших ГЭ-АЛК в дозах 440 и 110 мг/кг. Введение ГЭ-АЛК в дозе 880 мг/кг (кратной 1/10 от DL_{50ac}) привело к единичному случаю гибели на 8-е сутки опыта. При введении ГЭ-АЛК в дозе 1760 мг/кг, кратной 1/5 от DL_{50ac} , наблюдали гибель 7 из 10 особей в период на 3-11 сутки эксперимента.

Рассчитанная с помощью пробит-анализа [9] доза препарата, вызывающая в течение длительного введения гибель 50% взятых в эксперимент особей, позволила определить величину коэффициента кумуляции, который составляет для дозы, кратной 1/5 от DL_{50ac} – 1,6, а доля дозы, кратной 1/10 от DL_{50ac} – более 5,1. Таким образом, ГЭ-АЛК в данном эксперименте демонстрирует выраженные дозоза-

висимые эффекты проявления кумулятивных свойств на уровне летальных исходов.

Следует отметить, что и при оценке показателей биохимического статуса организма белых крыс, подвергнутых воздействию ГЭ-АЛК, регистрируется ряд дозозависимых изменений. Так, среди изученных показателей сыворотки крови белых крыс, получавших ГЭ-АЛК в субхроническом эксперименте, зарегистрированы изменения активности ферментов обмена аминокислот и увеличение содержания общего билирубина (табл. 1). Так, введение ГЭ-АЛК приводит к увеличению активности гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТ) в 1,5 раза и аланинаминотрансферазы (АЛТ) у животных группы III в 2,3 раза по сравнению с контролем, значение коэффициента де Ритиса данной группы снижалось до 2,4. Наряду с этим в сыворотке крови крыс групп III, IV, V отмечено достоверное дозозависимое повышение уровня содержания билирубина в 2, 1,6 и 1,3 раза по сравнению с величиной в контрольной группе.

Среди лабораторных показателей состояния белых крыс, подвергшихся воздействию ГЭ-АЛК в субхроническом эксперименте, изучен ряд параметров неспецифического гуморального иммунитета – содержание компонентов комплемента (C3, C4) и иммуноглобулинов А, G, M (табл. 2). Так, у животных группы III отмечено достоверное увеличение содержания компонента C3 в 1,5 раза и иммуноглобулина G на 28% по сравнению с контрольными значениями.

Со стороны функциональных показателей состояния мочевыводящей системы на 30-е сутки эксперимента при введении ГЭ-АЛК отмечалось увеличение содержания мочевины в моче животных группы V по сравнению с контролем в 1,6 раза, при этом значение клиренса мочевины в данной подопытной группе также увеличилось в 1,6 раза и не имеет достоверных отличий по сравнению с контрольным значением (табл. 3).

Изменение лабораторных показателей (в т.ч. иммунологических показателей) зафиксировано при воздействии ГЭ-АЛК в диапазоне токсических доз с наличием летальных исходов в группе, что не дает возможности выявить системного или органоспецифического влияния препарата, однако, свидетельствует о вовлечении печени в компенсацию вредного

Таблица 1 – Биохимические показатели сыворотки крови крыс при введении ГЭ-АЛК в субхроническом эксперименте, М(±95%ДИ)

Показатели, единицы измерения	Группы сравнения, величины вводимых доз			
	I-контрольная	III-опытная 880 мг/кг	IV-опытная 440 мг/кг	V-опытная 110 мг/кг
Общий белок, г/л	60,1 (52,2-68,0)	53,7 (42,1-65,2)	54,6 (46,2-62,9)	55,9 (48,4-63,3)
Альбумин, г/л	32,3 (24,3-40,2)	30,4 (22,4-38,3)	35,3 (29,6-41,0)	35,7 (28,5-42,9)
Мочевина, мМоль/л	5,5 (5,2-5,7)	6,5 (5,9-6,9) *	5,4 (4,9-5,9)	5,1 (4,4-5,7)
АЛТ, мккат/л	2,1 (1,6-2,6)	4,8 (2,4-7,2) *	1,8 (1,1-2,4)	1,6 (1,4-1,8)
АСТ, мккат/л	8,2 (6,2-10,2)	9,8 (6,4-13,2)	6,0 (4,8-7,2)	5,9 (4,9-6,9)
Коэффициент де Ритиса, усл.ед.	4,0 (3,7-4,4)	2,4 (1,9-2,8)*	3,6 (3,0-4,2)	3,7 (3,3-4,1)
Холестерин, мМоль/л	1,0 (0,6-1,5)	0,9 (0,7-1,2)	1,1 (0,8-1,4)	1,1 (0,4-1,7)
ЛПВП, г/мл	0,99 (0,96-1,01)	1,0 (0,98-1,01)	1,0 (0,98-1,01)	0,99 (0,96-1,01)
ЛПНП, г/мл	3,73 (3,69-3,76)	3,74 (3,7-3,77)	3,72 (3,7-3,75)	3,73 (3,7-3,77)
Билирубин общий, мкМоль/л	2,5 (2,2-2,9)	5,0 (3,8-6,2)*	3,9 (3,4-4,4)*	3,3 (2,8-3,7)*
Триглицериды, мМоль/л	0,29 (0,17-0,4)	0,3 (0,21-0,38)	0,35 (0,22-0,47)	0,27 (0,11-0,43)
Креатинин, мкМоль/л	54,6 (51,8-57,4)	52,2 (47,9-56,4)	56,7 (53,5-59,8)	56,6 (53,6-59,6)
Мочевая кислота, мкМоль/л	97,0 (87,7-106,7)	100,1 (90,3-109,9)	108,4 (102,9-113,8)	100,4 (94,2-106,7)
α-амилаза, мккат/л	7,9 (6,6-9,3)	7,5 (5,6-9,3)	6,5 (5,0-7,9)	7,5 (6,5-8,5)
Щелочная фосфатаза, мккат/л	1,7 (1,6-1,8)	1,6 (1,5-1,7)	1,6 (1,5-1,7)	1,7 (1,6-1,8)
Глюкоза, мМоль/л	6,8 (6,2-7,4)	7,4 (6,3-8,5)	6,7 (5,9-7,6)	6,5 (5,8-7,1)
Магний, мМоль/л	0,85 (0,8-0,91)	0,87 (0,79-0,95)	0,87 (0,82-0,92)	0,84 (0,78-0,9)
Фосфор, мМоль/л	1,6 (1,5-1,8)	1,5 (1,3-1,7)	1,7 (1,5-1,8)	1,6 (1,4-1,8)
Железо, мкМоль/л	42,9 (29,5-56,2)	44,9 (38,9-50,9)	52,8 (35,9-69,5)	47,0 (44,4-49,6)
ЛДГ, мккат/л	39,7 (29,2-50)	31,5 (19,7-43,3)	30,7 (23,7-37,6)	36,8 (27,5-46,1)
ГГТ, мккат/л	0,18 (0,17-0,19)	0,27 (0,2-0,34)*	0,2 (0,18-0,21)	0,19 (0,17-0,2),
Холинэстераза, мккат/л	86,1 (80,8-91,4)	83,8 (79,4-88,4)	88,0 (82,9-93,2)	81,5 (77,1-85,8)

Примечание: * - различия статистически достоверны, $p \leq 0,05$.

Таблица 2 – Иммунологические показатели белых крыс, получавших ГЭ-АЛК интрагастралью в субхроническом эксперименте, М(±95%ДИ)

Показатели, единицы измерения	Группы сравнения, величины вводимых доз			
	I-контрольная	III-опытная 880 мг/кг	IV-опытная 440 мг/кг	V-опытная 110 мг/кг
Компонент комплемента С3, г/л	2,9 (2,6-3,3)	4,4 (3,5-5,3)*	3,1 (2,9-3,4)	3,9 (2,7-5,1)
Компонент комплемента С4, г/л	2,8 (0,9-4,6)	3,1 (1,3-4,8)	2,8 (1,2-4,4)	3,2 (1,6-4,8)
Иммуноглобулин А, г/л	3,1 (2,0-4,1)	4,2 (3,3-5,2)	3,6 (2,4-4,9)	4,1 (2,9-5,3)
Иммуноглобулин G, г/л	95 (79-110)	122 (105-138)*	86 (73-98)	105 (92-117)
Иммуноглобулин М, г/л	5,4 (0,2-10,6)	6,8 (1,2-12,1)	4,4 (3,4-8,5)	5,4 (2,6-8,2)

Примечание: * - различия статистически достоверны, $p \leq 0,05$.

Таблица 3 – Показатели функционального состояния мочевыделительной системы белых крыс при внутрижелудочном введении ГЭ-АЛК в субхроническом эксперименте, М(±95%ДИ)

Показатели, единицы измерения	Группы сравнения, величины вводимых доз			
	I-контрольная	III-опытная 880 мг/кг	IV-опытная 440 мг/кг	V-опытная 110 мг/кг
Общий белок, г/л	8,5 (4,3-11,0)	11,3 (5,4-15,3)	8,5 (5,1-11,0)	8,3 (3,4-12,2)
Альбумин, г/л	5,2 (4,4-5,9)	4,9 (4,1-5,8)	4,7 (2,9-6,5)	4,6 (3,3-5,9)
Мочевина, мМоль/л	137,8 (91,2-184,4)	134,0 (91,1-176,8)	116,0 (92,7-139,3)	226,7 (169,4-284,0)
Клиренс мочевины, мл/мин	0,13 (0,1-0,16)	0,11 (0,03-0,19)	0,16 (0,13-0,18)	0,21 (0,12-0,31)
Креатинин, мМоль/л	4,8 (2,4-7,1)	3,8 (3,1-4,5)	3,1 (2,5-3,6)	7,1 (4,7-9,6)
Клиренс креатинина, мл/мин	0,45 (0,29-0,6)	0,35 (0,15-0,54)	0,4 (0,3-0,5)	0,59 (0,33-0,85)
Мочевая кислота, мкМоль/л	461,1 (269,5-652,7)	417,3 (287,3-547,2)	431,7 (340,4-522,9)	564,0 (385,1-742,9)
Глюкоза, мМоль/л	1,4 (1,2-1,6)	1,2 (0,95-1,5)	1,3(1,2-1,4)	1,6(1,4-1,8)
Диурез, л ³ /сутки	6,0 (4,1-7,9)	4,9 (3,02-6,8)	8,2 (5,9-10,4)	5,0 (3,8-6,2)
pH, ед. pH	7,1 (6,9-7,3)	7,1 (6,9-7,3)	7,2 (7,1-7,4)	7,3 (7,2-7,4)
Удельная плотность, г/мл	1,02(1,01-1,03)	1,01 (0,99-1,02)	1,02 (1,0-1,03)	1,02 (1,01-1,03)

Таблица 4 – Характеристика микросомальной фракции печени крыс, получавших ГЭ-АЛК в субхроническом эксперименте

Концентрация цитохромов P450 и P420, нмоль/мл микросомальной фракции	Концентрация общего белка, мг/мл микросомальной фракции	Удельное содержание цитохромов P450 и P420, нмоль/мг общего белка	Активность P450-редуктазы, Ед/мл микросомальной фракции	Удельная активность P450-редуктазы, Ед/мг общего белка
Контроль (дист. вода)				
11,5 / 4,5	21,7	0,53 / 0,21	4,8	0,22
Опыт (440 мг/кг ГЭ-АЛК)				
12,6 / 10,8	17,2	0,73 / 0,63	5,9	0,34

воздействия (повышение уровня билирубина). Одновременно, препарат оказывает гепатотоксическое действие, реализуемое путем цитолиза (развитие гиперферментемии), патофизиологической основой которого является нарушение целостности плазматической мембраны гепатоцитов и их органелл.

Изучение биохимических механизмов детоксикации, связанных с функционированием микросомальных монооксигеназ гладкого эндоплазматического ретикулаума печени, позволяет выявить особенности повреждающего действия яда, определить тип его влияния на систему цитохрома P450, а также служит основой для поиска средств профилактики и лечения интоксикаций [9].

Изучение системы детоксикации ксено-

биотиков производили у крыс, получавших интрагастрально максимально переносимую дозу субхронического воздействия - 440 мг/кг ГЭ-АЛК. На первоначальном этапе исследований охарактеризована полученная микросомальная фракция печени подопытных животных группы IV по содержанию цитохромов P450 и P420, а также определены концентрация общего белка и активность P450-редуктазы (табл. 4).

Так, введение ГЭ-АЛК приводило к увеличению в 1,4 раза удельного содержания цитохрома P450 с аналогичным в 1,5 раза увеличением удельной активности P450-редуктазы в сравнении с контрольными значениями. При этом наблюдали повышение уровня удельного содержания цитохрома P420 в 3 раза отно-

сительно контроля. Цитохром P420 впервые описан исследователями в связи с неудачными попытками солибилизировать цитохром P450 в нативном виде - в результате опытов фермент утрачивал функциональные свойства, а максимум поглощения комплекса монооксид углерода с гемопротеидом сдвигался в коротковолновую область. Оказалось, что обработка микросомальной фракции 1%-м бутанолом или 0,5%-м гексанолом способствует переходу цитохрома P450 в форму P420 [10]. Дальнейшими исследованиями показано, что такой эффект наблюдается не только при солибилизации, но и при воздействии веществ различной химической природы, таких, как мочевины, хлоргидрат гуанидина, детергенты, фосфолипазы, концентрированные растворы солей, кислот и щелочей [11-14]. Цитохром P450 является мембраносвязанным белком и проявление его активности возможно только в присутствии фосфолипидного окружения, которое стабилизирует фермент в функционально активной конформации [15]. Таким образом, появление большого количества инактивированного фермента в печени крыс, получавших ГЭ-АЛК может быть связано со структурными изменениями биологических мембран под воздействием препарата.

Функционирование монооксигеназной системы оценивали по основным кинетическим параметрам катализируемых цитохромом P450 реакций *O*-деалкилирования 7-этоксикумарина и 7-этоксирезорурфина. Кинетические параметры реакций окисления указанных субстратов микросомальной фракцией

печени крыс, получавших интрагастрально 440 мг/кг ГЭ-АЛК в субхроническом эксперименте, представлены в таблице 5.

Из таблицы 5 видно, что введение подопытным животным ГЭ-АЛК не приводило к индукции/ингибированию изоформ цитохрома P450 с повышенным сродством к изученным субстратам (изоформы 1A1, 1A2, 1B1, 2B2). На это указывают рассчитанные для реакций окисления 7-этоксикумарина и 7-этоксирезорурфина величины V_{max} и K_m , которые у крыс, получавших ГЭ-АЛК, не имеют существенных отличий от контрольных величин.

Заключение

Введение ГЭ-АЛК белым крысам в субхроническом эксперименте приводит к изменению ряда лабораторных биохимических показателей функционирования печени, что отражается на увеличении активностей аланинаминотрансферазы и гамма-глутамилтранспептидазы, снижении величины коэффициента де Ритиса. При этом наблюдается также дозозависимое повышение уровня общего билирубина.

В результате изучения каталитической активности цитохрома P450 оказалось, что ГЭ-АЛК не приводит к изменению V_{max} и K_m в реакциях *O*-деалкилирования 7-этоксикумарина и 7-этоксирезорурфина, следовательно, не влияет на детоксикационную функцию печени. При этом в печени подопытных животных наблюдается накопление цитохрома P420, что может рассматриваться как проявление общетоксического действия на фоне ежедневного

Таблица 5 – Кинетические параметры цитохрома P450 печени крыс при воздействии ГЭ-АЛК в субхроническом опыте

В реакции с 7-этоксикумарином			В реакции с 7-этоксирезорурфином		
C_{P450} , пмоль/мл	V_{max} , пмоль/(пмоль×мин)	K_m , мкМ	C_{P450} , пмоль/мл	V_{max} , пмоль/(пмоль×мин)	K_m , мкМ
Контроль (дист. вода)					
9,2	0,18 (0,17-0,19)	1,6 (1,1-2,1)	63,0	0,12 (0,11-0,13)	21,4 (15,4-27,4)
Опыт (440 мг/кг ГЭ-АЛК)					
10,1	0,21 (0,19-0,23)	1,7 (1,2-2,1)	57,7	0,12 (0,10-0,14)	22,6 (15,3-30,0)

Примечание: C_{P450} – концентрация цитохрома P450 в реакционной смеси, пмоль/мл; V_{max} – максимально достижимая скорость ферментативной реакции, образование продукта в единицу времени, отнесенные к C_{P450} , пмоль продукта/(пмоль цитохрома P450×мин реакции); K_m – константа Михаэлиса, концентрация субстрата, при которой достигается $1/2 V_{max}$, мкМ.

введения максимально переносимой дозы препарата в подостром эксперименте.

В целом, характер выявленных изменений биохимических показателей (в т.ч. характеризующих состояние монооксигеназной системы) у подопытных животных, получавших ГЭ-АЛК в субхроническом эксперименте, может свидетельствовать о присутствии мембраноповреждающего компонента в действии препарата.

Литература

1. Каган, Ю. С. Коэффициент кумуляции как количественный критерий / Ю. С. Каган, В. В. Станкевич // Актуальные вопросы гигиены труда, промышленной токсикологии и профессиональной патологии в нефтяной и нефтехимической промышленности. - Уфа, 1964. - С. 48-49.
2. van der Hoeven, T. A. Preparation and properties of partially purified cytochrome P-450 and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P-450 reductase from rabbit liver microsomes / T. A. van der Hoeven, M. J. Coon // J. Biol. Chem. - 1974 Oct. - Vol. 249, N 19. - P. 6302-6310.
3. Omura, T. The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes. II. Solubilization, Purification, and Properties / T. Omura, R. Sato // J. Biol. Chem. - 1964 Jul. - Vol. 239. - P. 2379-2385.
4. Биохимическое исследование мембран / под ред. Э. Мэдди. - Москва : Мир, 1979. - 460 с.
5. Vermilion, J. L. Identification of the high and low potential flavins of liver microsomal NADPH-cytochrome P-450 reductase / J. L. Vermilion, M. J. Coon // J. Biol. Chem. - 1978 Dec. - Vol. 253, N 24. - P.

- 8812-8819.
6. Aitio, A. A simple and sensitive assay of 7-ethoxycoumarine deethylation / A. Aitio // Anal. Biochem. - 1978 Apr. - Vol. 85, N 2. - P. 488-491.
7. Burke, M. D. Inherent specificities of purified cytochromes P-450 and P-448 toward biphenyl hydroxylation and ethoxyresorufin deethylation / M. D. Burke, R. T. Mayer // Drug. Metab. Dispos. - 1975 Jul-Aug. - Vol. 3, N 4. - P. 245-253.
8. Guide for the care and use of laboratory animals / Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Institute for Laboratory Animal Research, Division on Earth and Life Studies. - Washington : National academy press, 1996. - 220 p.
9. Бельский, М. Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта / М. Л. Бельский. - Рига : Изд-во Акад. наук Латв. ССР, 1959. - 115 с.
10. Голиков, С. Н. Общие механизмы токсического действия / С. Н. Голиков, И. В. Саноцкий, Л. А. Тиунов. - Ленинград : Медицина, 1986. - 280 с.
11. Арчаков, А. И. Микросомальное окисление / А. И. Арчаков. - Москва : Наука, 1975. - 327 с.
12. Omura, T. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature / T. Omura, R. Sato // J. Biol. Chem. - 1964 Jul. - Vol. 239. - P. 2370-2378.
13. Imai, Y. Conversion of P-450 to P-420 by neutral salts and some other reagents / Y. Imai, R. Sato // Eur. J. Biochem. - 1967 Jun. - Vol. 1, N 4. - P. 419-426.
14. Mason, H. S. Microsomal mixed-function oxidations: the metabolism of xenobiotics / H. S. Mason, J. C. North, M. Vanneste // Fed. Proc. - 1965 Sep-Oct. - Vol. 24, N 5. - P. 1172-1180.
15. Адрианов, Н. В. Регуляция активности ферментных систем окисления чужеродных соединений / Н. В. Адрианов, В. Ю. Уваров // Вестн. АМН СССР. - 1988. - № 1. - С. 24-33.

Поступила 14.07.2015 г.

Принята в печать 11.12.2015 г.

References

1. Kagan YuS, Stankevich VV. Koeffitsient kumulatsii kak kolichestvennyi kriterii [Cumulation coefficient as quantitative criterion]. V: Aktual'nye voprosy gigieny truda, promyshlennoi toksikologii i professional'noi patologii v neftianoi i neftekhimicheskoi promyshlennosti. Ufa, RF; 1964. P. 48-9.
2. van der Hoeven TA, Coon MJ. Preparation and properties of partially purified cytochrome P-450 and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P-450 reductase from rabbit liver microsomes. J Biol Chem. 1974 Oct 10;249(19):6302-10.
3. Omura T, Sato R. The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes. II. Solubilization, Purification, and Properties. J Biol Chem. 1964 Jul;239:2379-85.
4. Meddi E, red. Biokhimicheskoe issledovanie membran [Biochemical research of membranes]. Moscow, RF: Mir; 1979. 460 p.

5. Vermilion JL, Coon MJ. Identification of the high and low potential flavins of liver microsomal NADPH-cytochrome P-450 reductase. J Biol Chem. 1978 Dec;253(24):8812-9.
6. Aitio A. A simple and sensitive assay of 7-ethoxycoumarine deethylation. Anal Biochem. 1978 Apr;85(2):488-91.
7. Burke MD, Mayer RT. Inherent specificities of purified cytochromes P-450 and P-448 toward biphenyl hydroxylation and ethoxyresorufin deethylation. Drug Metab Dispos. 1975 Jul-Aug;3(4):245-53.
8. Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Institute for Laboratory Animal Research, Division on Earth and Life Studies. Guide for the care and use of laboratory animals. Washington: National academy press; 1996. 220 p.
9. Belenkiy ML. Elementy kolichestvennoi otsenki farmakologicheskogo efekta [Elements of a quantitative assessment of pharmacological effect]. Riga, Latvia:

- Izd-vo Akad nauk Latv SSR; 1959. 115 p.
10. Golikov SN, Sanotskiy IV, Tiunov LA. Obshchie mekhanizmy toksicheskogo deistviia [General mechanisms of toxic action]. Leningrad, RF: Meditsina; 1986. 280 p.
 11. Archakov AI. Mikrosomal'noe okislenie [Microsomal oxidation]. Moscow, RF: Nauka; 1975. 327 p.
 12. Omura T, Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. J Biol Chem. 1964 Jul;239:2370-8.
 13. Imai Y, Sato R. Conversion of P-450 to P-420 by neutral salts and some other reagents. Eur J Biochem. 1967 Jun;1(4):419-26.
 14. Mason HS, North JC, Vanneste M. Microsomal mixed-function oxidations: the metabolism of xenobiotics. Fed Proc. 1965 Sep-Oct;24(5):1172-80.
 15. Adrianov NV, Uvarov VYu. Reguliatsiia aktivnosti fermentnykh sistem okisleniia chuzherodnykh soedinenii [The regulation of the activity of enzyme systems oxidation foreign compounds]. Vestn AMN SSSR. 1988;(1):24-33.

Received 14.07.2015

Accept 11.12.2015

Сведения об авторах:

Власенко Е.К. - научный сотрудник лаборатории профилактической и экологической токсикологии РУП «Научно-практический центр гигиены»;

Сычик С.И. - к.м.н., доцент, директор РУП «Научно-практический центр гигиены»;

Стельмах В.А. - к.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории профилактической и экологической токсикологии РУП «Научно-практический центр гигиены»;

Ильюкова И.И. - к.м.н., заведующая лабораторией профилактической и экологической токсикологии РУП «Научно-практический центр гигиены»;

Грынчак В.А. - младший научный сотрудник лаборатории профилактической и экологической токсикологии РУП «Научно-практический центр гигиены».

Адрес для корреспонденции: Республика Беларусь, 220012, г. Минск, ул. Академическая, 8, Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр гигиены». E-mail: evgenii_vlasenko@mail.ru – Власенко Евгений Константинович.