

7. *Мартirosян М. Е.* Ж. экспер. и клин. мед. АН Арм. ССР, 1980, т. 20, 3, стр. 252.
8. *Мещерская К. А., Бородин Г. П.* Тезисы секционных сообщений (2-й биох. Всес. съезд), 21 секция. Биохимическая фармакология. Ташкент, 1969, стр. 53.
9. *Розенцвейг К. И.* Лаб. дело, 1962, 9, стр. 43.
10. *Трандофилова Г. М.* В кн.: Физиология, биохимия и патология эндокринной системы. Киев, 1969, стр. 228.
11. *Финагин Л. К., Кожура И. М., Заика М. У.* Бюлл. экспер. биол. и мед., 1978, 2, стр. 155.
12. *Шаркевич И. Н., Фисун С. Д.* В кн.: Физиология, биохимия и патология эндокринной системы. Киев, 1971, стр. 128.
13. *Bergmeyer H. U.* Herausgegeben von Methoden der enzymatischen Analyse, 3 Auflage 1, 1974, 624.
14. *Burstein M., Samaille J. S. C. R. Acad. Sci.,* 1955, 241, 9, 664.
15. *Friedmann T. E., Haugen G. E. J. Biol. Chem.,* 1944, 147, 415.

УДК 616—099+615.9:632.95

В. Д. ЛУКЬЯНЧУК, А. И. ЛУИК

ТОКСИЧНОСТЬ И СРОДСТВО К АЛЬБУМИНУ ПЕСТИЦИДОВ В ПРОЦЕССЕ ИХ БИОТРАНСФОРМАЦИИ

Изучены количественные параметры комплексообразования (константа ассоциации и число мест фиксации) сывороточного альбумина человека с динитрофенольным пестицидом—акрексом и его метаболитом—диносебом. Методами спектрофлуориметрии и равновесного диализа исследовались также молекулярные механизмы взаимодействия белка с пестицидами. Полученные результаты сравнивались с данными токсичности акрекса и диносеба для животных и культуры клеток.

Согласно данным литературы [5, 9, 12], взаимодействие лекарственных средств с белками сыворотки крови приводит к уменьшению фармакологической активности препаратов, т. к. в клетки организма проникает только свободная фракция вещества. Относительно к токсическим соединениям это подобно снижению их токсических свойств (острой токсичности). Исследования Mourik J., de Jong L. [11] по изучению параметров взаимодействия с сывороточным альбумином двух органофосфатов: паратиона и его метаболита—параоксона подтвердили данное предположение и показали, что менее токсичное исходное вещество—паратион обладает меньшей степенью сродства к альбумину, чем более токсичный его метаболит—параоксон.

В мировой литературе имеется крайне мало сведений о взаимодействии ядов с сывороточными белками крови вообще и сывороточным альбумином, в частности. Поэтому приведенные данные [11] не представляется возможным считать основанием для каких-либо обобщений.

В связи с этим представляло интерес изучить влияние связывания с альбумином сыворотки крови человека другой пары ядов: 4,6-динитрофенилизопропилкарбоната (акрекс) и его метаболита—2,4-динитро-6-фтор-бутилфенола (диносеб) на их токсичность, что составило цель данной работы.

Диносеб образуется в процессе биотрансформации акрекса в организме теплокровных. Вместе с тем диносеб, как и его исходный продукт, имеет самостоятельное применение в народном хозяйстве. Они используются в качестве пестицидных препаратов, обладающих довольно широким спектром действия, и представляют известную опасность для здоровья лиц, контактирующих с ними. В этой связи результаты настоящего сообщения имеют не только теоретический интерес, но и определенную практическую значимость.

Методика исследования

Процессы взаимодействия акрекса и диносеба с кристаллическим сывороточным альбумином человека (САЧ) фирмы «Reanal» исследовали методами спектрофлуориметрии и равновесного диализа. При этом определяли количественные параметры комплексообразования: константы ассоциации ($K_{асс}$) комплекса альбумин—пестицид и число мест фиксации на молекуле альбумина (N).

В $1 \cdot 10^{-5}$ М раствор альбумина в изотоническом фосфатном буфере (рН 7,4) вносили изучаемые вещества в различных молярных соотношениях. Спектры люминесценции белка регистрировали на спектрофлуориметре «Hitachi MPF-4» при длине волны возбуждения 280 нм. Количественную оценку комплексообразования проводили по предложенной нами ранее методике [2, 3]. С целью введения поправок на реабсорбцию и экранирование [1] параллельно определяли спектры поглощения соответствующих растворов альбумина и изучаемых веществ в диапазоне 250—350 нм на двухлучевом спектрофотометре «Schimadzu MPS-5000». Наличие обратимого связывания ядов с альбумином контролировалось классическим методом равновесного диализа в модифицированных нами аппаратах С. И. Чегера [6].

Каждая диализная камера аппарата состоит из двух ячеек емкостью 5 и 10 мл, разделенных полупроницаемой мембраной. В малые ячейки вносили 0,5 мл 4% САЧ и 4,5 мл акрекса либо диносеба в фосфатном буфере (рН 7,4) и физиологическом растворе (1:9). В большие ячейки вносили 10 мл фосфатного буфера и физиологического раствора в таком же соотношении. Одновременно заполняли контрольную пару ячеек с такой же концентрацией яда, но вместо САЧ вносили 0,5 мл буфера с физиологическим раствором. Диализное равновесие наступало через 1 сутки при комнатной температуре. После этого определяли концентрацию вещества в больших ячейках, т. е. в тех, где не содержится белок. Количество пестицида в большой ячейке опытной камеры соответствует концентрации вещества, не связанной с белком,—свободно диффундирующей фракции. При этом осуществляли поправку на адсорбцию яда на мембране и стенках камеры, которая не превышала 0,05—0,1% от внесенного количества вещества в ячейку.

Количественные параметры комплексообразования по данным равновесного диализа рассчитывали графическим методом в координатах Scatchard [13] на ЭВМ «Наири 3-1».

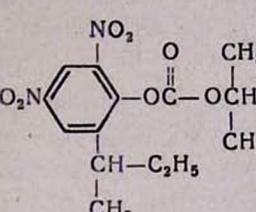
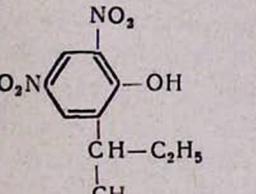
Острую токсичность акрекса и диносеба определяли на крысах обоего пола линии Wistar при пероральном введении. Цитотоксические свойства веществ исследовали на клеточных культурах Vero. При этом цитотоксическую активность оценивали количественно путем определения содержания общего белка в культурах клеток по Lowry [10] после двухсуточной экспозиции. Токсикометрические показатели: среднесмертельную дозу (LD_{50}) и среднецитотоксическую дозу (CTD_{50}) в обоих случаях рассчитывали методом наименьших квадратов для пробит-анализа кривых летальности, предложенным В. Б. Прозоровским [4].

Результаты и их обсуждение

Полученные данные представлены в таблице.

Таблица

Химическое строение, параметры связывания с сывороточным альбумином и характеристики токсичности акрекса и диносеба

Исследуемые соединения	Параметры связывания с сывороточным альбумином*		Характеристика токсичности	
	спектрофлуориметрия	равновесный диализ	в опытах на крысах (LD_{50} , мг/кг)	в опытах на клеточных культурах (CTD_{50} , мкг/мл)
<p>Акрекс</p> 	$K_{асс} = 6,2 \cdot 10^4 M^{-1}$ $N = 2$	$K_{асс} = 2,50 \cdot 10^3 M^{-1}$ $N = 18$	$127,00 \pm 10,80$	$9,8 \pm 1,07$
<p>Диносеб</p> 	$K_{асс} = 2,0 \cdot 10^6 M^{-1}$ $N = 2$	$K_{асс} = 0,90 \cdot 10^3 M^{-1}$ $N = 12$	$41,00 \pm 4,70$	$0,126 \pm 0,018$

* $K_{асс}$ — константа ассоциации комплекса; N — число мест связывания.

Методом равновесного диализа установлено, что изучаемые соединения вступают в обратимую связь с САЧ. Спектрофлуориметрические исследования свидетельствуют о том, что взаимодействию как акрекса, так и диносеба с альбумином предшествуют конформационные изменения белковой молекулы. Конформационный переход молекулы альбумина является результатом взаимодействия пестицида с высокочувствительными рецепторами САЧ. Наличие таких высокоаффинных рецепторных участков альбумина, ответственных за конформационную пере-

стройку третичной структуры молекулы белка, взаимодействующего с ядом, нами было установлено ранее [2] при исследовании процессов связывания САЧ с родоначальным представителем группы динитрофенольных пестицидов (к этой же группе относятся акрекс и диносеб) — динитроортокрезола.

По данным люминесцентных исследований, приведенным в таблице, видно, что акрекс и диносеб имеют 2 высокоаффинных рецептора на молекуле белка. Это дает основание предположить, что из трех имеющихся доменов молекулы САЧ [7] в связывании обоих соединений принимают участие только два. Анализируя величины K_{acc} комплексов САЧ-пестицид, видим, что сродство акрекса к рецепторам, ответственным за адаптивную перестройку молекулы альбумина, значительно ниже (на 1,5 порядка), чем у его метаболита диносеба (таблица).

Из данных же равновесного диализа следует, что основные связывающие центры САЧ по отношению к акрексу и диносебу имеют низкую степень сродства, но достаточно высокую емкость. Так, число мест фиксации акрекса и диносеба на молекуле альбумина соответственно равно 18 и 12. Имея некоторое преимущество в числе мест связывания, акрекс существенно (в 3,9 раза) уступает диносебу по величине K_{acc} , т. е. по аффинитету связи. Интересно, что токсичность акрекса для животных также ниже (в 3,1 раза), чем у его метаболита — диносеба. Такая же закономерность прослеживается и в опытах на клеточных культурах Vero — преобладание токсичности диносеба проявляется в еще большей степени (таблица).

Таким образом, полученные нами данные противопоставляются таковым в исследованиях Mourik J., de Jong L. [11]. Установлено, что более токсичный метаболит (диносеб) характеризуется большей степенью сродства к альбумину сыворотки крови человека, чем его менее токсичный исходный продукт — акрекс. Отмеченное противоречие можно объяснить тем, что сравниваемые пары ядов (паратрион и параоксон, акрекс и диносеб) различаются общим уровнем сродства к альбумину. Так, паратрион и параоксон имеют константы ассоциации с белком порядка 10^4 — 10^6 M^{-1} . У изучаемых же нами пестицидных препаратов константы ассоциации значительно (на 2—3 порядка) ниже. Можно думать, что при снижении сродства пестицидов к альбумину сыворотки крови в интервале величин констант ассоциации от 10^{4-6} до 10^{2-3} M^{-1} наступают качественно новые изменения во взаимоотношениях между степенью сродства к белку и токсическими свойствами. Иными словами, при более высоких значениях констант ассоциации комплекса альбумин—пестицид токсичность яда находится в прямой, а при низких — в обратной зависимости от степени аффинитета связи вещества с белком.

Нам представляется, что различия в токсичности (для животных и культуры клеток) исходных веществ и их метаболитов не могут быть объяснены только различиями во взаимоотношениях пестицидов с белками сыворотки крови. В пользу этого говорит также тот факт, что

низкое сродство химических веществ к альбумину, характерное для акрекса и диносеба, по данным Jusko W. J., Gretch M. [8], не может оказывать существенного влияния на токсические параметры. Полученные данные позволяют считать, что при низких (порядка 10^{2-3} M^{-1}) значениях константы ассоциации степень взаимодействия веществ с альбумином не лимитирует перехода токсического агента в ткани, но в определенной степени лишь отражает его интегральное сродство к биосубстратам в целом и, в частности, характеризует способность яда проникать в клетки. Этот факт согласуется с результатами наших опытов на клеточных культурах. Диносеб, обладающий меньшим, чем акрекс, сродством к альбумину, оказывает значительно более выраженное цитотоксическое действие на клетки Vero.

Таким образом, проведенными исследованиями экспериментально доказана зависимость токсичности от степени сродства к сывороточному альбумину пестицидов в процессе их метаболизма. Полученные данные расширяют существующие представления о токсикокинетике динитрофенольных пестицидов.

Лаборатория экспериментальной терапии
ВНИИГИНТОКСа

Поступила 5/IX 1981 г.

Վ. Դ. ԼՈՒԿՅԱՆՉՈՒԿ, Ա. Ի. ԼՈՒԻԿ

**ԹՈՒՆԱՔԻՄԻԿԱՏՆԵՐԻ ԹՈՒՆԱՎՈՐՈՒԹՅՈՒՆԸ ԵՎ ԱԶԳԱԿՑՈՒԹՅՈՒՆԸ
ԱՂՐՈՒՄԻՆՆԵՐԻ ՆԿԱՏԱՄԱՐ ԲԻՈՏՐԱՆՍՖՈՐՄԱՑԻԱՅԻ ԸՆԹԱՑՔՈՒՄ**

Հաստատվել է, որ թունաքիմիկատների թունավորության բարձրացումը օրգանիզմում կատարվող փոխանակության պրոցեսների ընթացքում ուղեկցելով է այդ նյութերի ալբումինների նկատմամբ ազդակցության մեծացումով: Եկել են այն եզրակացության, որ այդպիսի փոփոխությունները բնորոշ են այն թույններին, որոնք ունեն ասոցիացիայի կոմպլեքսների ցածր հաստատուն (10^2-10^3 M^{-1}) շիճուկային սպիտակուցների հետ: Այլ միացությունների համար ավելի բարձր կապի աֆինիտետով (ասոցիացիայի հաստատունների 10^4-10^6 M^{-1} մեծությամբ) հատկանշական է հետադարձ կախվածություն:

V. D. LOUKYANCHOUK, A. I. LOUIK

**TOXICITY AND AFFINITY TO ALBUMIN OF PESTICIDES IN THE
PROCESS OF THEIR BIOTRANSFORMATION**

The quantitative parameters of the complex development of the human serum albumin with dinitrophenolic pesticide—acrex and its metabolite—dinoseb have been studied. By the method of spectrofluorimetry and equilibrical dialysis the molecular mechanisms of interaction of albumin with pesticides have been studied. The results obtained have been compared with the data of toxicity of acrex and dinoseb for the animals and cell culture.

1. Лихтенштейн Г. И., Пивоваров А. П., Смолина Н. Б. Молекул. биол., 1968, т. 2, 3, стр. 291.
2. Луйк А. И., Лукьянчук В. Д. ДАН УССР (сер. Б), 1981, 3, стр. 73.
3. Луйк А. И., Новикова Н. В. Фармакол. и токсикол., 1980, 5, стр. 593.
4. Прозоровский В. Б. Фармакол. и токсикол., 1962, 1, стр. 115.
5. Фирсов А. А., Кивман Г. Я., Гейтман И. Я., Неугодова Н. П. Хим. фарм. журн., 1979, т. 13, 12, стр. 5.
6. Чегер С. И. Транспортная функция сывороточного альбумина. Бухарест, 1975.
7. Brown J. In: Albumin structure, function and uses (Ed. by v. Rosenoer e. a.) Perg. Press, 1977.
8. Jusko W. J., Gretch M. Drug Metabolism Reviews, 1976, 5 (1), 43.
9. Koch-Weser J., Sellers E. New. Engl. J. Med., 1976, v, 294, 6, 311.
10. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. Z., Randall R. J. J. Biol. Chem., 1951, v. 193, 3, 265.
11. Mourik J., de Jong L. Arch. Toxicol., 1978, v. 41, 1, 43.
12. Nakano M., Hirotsami I., Goto S., Araky I. Chem. and Pharm. Bull., 1980, 28, № 8, 2301.
13. Scatchard J. Ann. N. G. Acad. Sci., 1949, v. 51, 660.

УДК 616.61:616.44

Э. Э. МХЕЯН

АКТИВНОСТЬ ТРАНСПОРТНЫХ АТФаз МИКРОСОМ ПОЧЕК КРЫС ПРИ ГИПОПАРАТИРЕОЗЕ

Изучена активность мембранных транспортных ферментов Na^+ , K^+ -АТФазы и Ca^{2+} Mg^{2+} -АТФазы в микросомальной фракции коркового слоя почек белых крыс при гипопаратиреозе. Выявлено, что на 5-е сутки после электрокоагуляции околотитовидных желез на фоне развившейся гипокальциемии транспортные АТФазы значительно активизируются.

В механизме действия паратормона (ПГ) значительную роль играет процесс транспорта ионов через мембрану клетки.

При гипофункции околотитовидных желез наряду с нарушением функции других органов имеет место заметное отклонение функций почек от нормы. Установлено, что почки, являющиеся «органом—мишенью» для ПГ, имеют специфические рецепторы, связывающие ПГ [9], и считаются основным органом, экстрагирующим ПГ из циркулирующей крови и осуществляющим его катаболизм [7]. Имеются многочисленные данные, свидетельствующие об изменении минерального обмена в почечной ткани под действием ПГ [6, 10]. Достаточно изучены вопросы регуляции экскреции и реабсорбции различных ионов почками при гипо- и гиперпаратиреозе [5, 8]. Исследована активность АТФаз митохондриальных мембран при введении в организм ПГ и добавлении его *in vitro* [3].

Однако вопрос об энергозависимом транспорте одно- и двухвалентных катионов через мембрану почечных клеток при гипопаратиреозе остается открытым.