

Abstract

*Kucheriavchenko M. A. *,
Kharkov National Medical
4 Lenina Avenue, Kharkov,
61022, Ukraine*

THE EFFECT OF LAPROXIDES ON BLOOD SERUM PHOSPHORESCENCE INTENSITY IN SUBACUTE TRIAL AND ITS PROGNOSTIC VALUE

Introduction. The investigated xenobiotics are employed to produce plastic, epoxide resins, varnishes, enamels, paints, foam plastic and et cetera. The study of pathophysiological mechanisms triggering structural and metabolic disorders in response to prolonged subtoxic exposure on the body was commissioned by the absence of prognostic characteristics of potential danger, which laproxides can constitute for hematothermal animals and humans. The study showed that determination of integral intensity of blood serum phosphorescence would become a promising methodological approach in early diagnosis of blood serum protein capacity. Considering its high sensitivity and informative value, phosphorescence enables to detect abnormalities when studying electron excitation states of molecules, photochemical reactions, fast molecular transition dynamics, structures and properties of chemical and biological systems. Properties and differences of protein exchange and their conformational compact structure tend to develop with the progression of the impairment. Previous studies have confirmed that alteration of qualitative properties of proteins is always associated with the impairment of their main functions, such as enzyme, hormone, receptor, transport, structural, mechanical, supporting, reserve, substrate-energetic, contractile, electro-osmotic, energy transforming, cogenic, gene regulating, immunologic, anti-toxic, neutralizing and hemostatic functions.

The aim was to determine the effect of laproxides in response to prolonged subtoxic exposure on the indices of blood serum phosphorescence in white rats and assess its prognostic value.

Material and Methods. The study implied determination of blood serum phosphorescence intensity in animals exposed to peroral exposure to epoxide-containing oligo-ethers in dosages of 1/10; 1/100 and 1/1000 DL₅₀ during 45 days. New substances (the trade name "Laproxides") were employed, namely triglycidyl ether of polyoxypropylene triol with molecular mass 303 (L-303) and ethylene glycol propylene epoxide with molecular mass 500 (L-500). Aqueous solutions of the substances at the above mentioned doses were administered endogastrically with a metal feeding tube on an empty stomach in the morning. The control group received corresponding doses of drinking water.

Discussion. The study of laproxides L-303 and L-500 effect showed a significant increase in blood serum phosphorescence intensity in the group of animals in response to peroral exposure to xenobiotics in 1/10 and 1/100 DL₅₀ dosages in spectral lines of excitation light 297; 313; 334; 365; 404 and 434 nm. In 1/1000 DL₅₀ the substances did not exert any effect on blood serum phosphorescence intensity rate. Thus, high levels of phosphorescence intensity indicate that laproxides at subtoxic doses of 1/10

and 1/100 DL₅₀ induce the development of significant amount of reactive molecules, capable to condition chain reactions of lipids, proteins, nucleic acids and other biological substrates oxidation. The results show that these compounds are capable of changing conformational properties of proteins, nucleic acids and nucleotides, as well as their functional activity, resulted from the formation of free radical membrane pathology.

Key words: xenobiotics, laproxides, blood serum phosphorescence.

Corresponding author: * shevtsova_marina@ukr.net

Резюме

Кучерявченко М. А. *,
Харьковский национальный
медицинский университет,
пр. Ленина, 4, Харьков,
61022, Украина

ВЛИЯНИЕ ЛАПРОКСИДОВ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ ФОСФОРЕСЦЕНЦИИ СЫВОРОТКИ КРОВИ В ПОДОСТРОМ ОПЫТЕ И ЕЕ ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Эксперимент был проведен на белых крысах-самцах популяции Вистар. Целью работы являлось изучение влияния простых полиэфиров в условиях субтоксического длительного воздействия на показатели интенсивности фосфоресценции сыворотки крови и определение ее прогностического значения. После проведенного эксперимента было выявлено существенное усиление интенсивности фосфоресценции сыворотки крови у групп животных, подвергавшихся пероральному воздействию ксенобиотиками в дозах 1/10 и 1/100 ДЛ₅₀. Это свидетельствует о том, что лапроксины в субтоксических дозах 1/10 и 1/100 ДЛ₅₀ потенцируют образование значительного количества реакционноспособных молекул, которые обладают свойствами вести цепные реакции окисления липидов, белков, нуклеиновых кислот и других биологических субстратов. В 1/1000 ДЛ₅₀ вещества не оказывали влияния на показатели интенсивности фосфоресценции сыворотки крови. Анализ показывает, что исследуемые ксенобиотики способны изменять конформационные свойства протеинов, нуклеиновых кислот и нуклеотидов, а также их функциональную активность, в основе чего лежит формирование свободнорадикальной мембранной патологии.

Ключевые слова: ксенобиотики, лапроксины, фосфоресценция сыворотки крови.

Резюме

Кучерявченко М. О. *,
Харківський національний
медичний університет,
пр. Леніна, 4, Харків, 61022,
Україна

ВПЛИВ ЛАПРОКСИДІВ НА ІНТЕНСИВНІСТЬ ЕКСПЕРИМЕНТІ ОРЕСЦЕНЦІЇ СІРОВАТКИ КРОВІ У ПІДГОСТРОМУ ОПИТІ ТА ЇЇ ПРОГНОСТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ

Експеримент було проведено на білих щурах-самцях популяції Вістар. Метою роботи було вивчення впливу простих поліефірів в умовах субтоксичної тривалої дії на показники інтенсивності фосфоресценції сироватки крові та визначення її прогностичного значення. Після проведеного експерименту було виявлене істотне посилення інтенсивності фосфоресценції сироватки крові у груп тварин, які зазнавали перорального впливу ксенобіотиками дозами 1/10 та 1/100 ДЛ₅₀. Це свідчить про те, що лапроксины у субтоксичних дозах 1/10 та 1/100 ДЛ₅₀ потенціюють утворення значної кількості реакційноздатних молекул, які мають властивості проводити ланцюгові реакції окиснення ліпідів, білків, нуклеїнових

кислот та інших біологічних субстратів. У 1/1000 ДЛ₅₀ речовини не впливали на показники інтенсивності фосфоресценції сироватки крові. Аналіз засідчує, що досліджувані ксенобіотики здатні змінювати конформаційні властивості протеїнів, нуклеїнових кислот і нуклеотидів, а також їх функціональну активність, в основі чого полягає формування вільнорадикальної мембранної патології.

Ключові слова: ксенобіотики, лапроксида, фосфоресценція сироватки крові.

Автор, відповідальний за кореспонденцію: * shevtsova_marina@ukr.net

Введение

Молекулярная характеристика компактной структуры белков раскрывает представление об основах формирования структурно-метаболических нарушений и патологических состояний. Изучение молекулярных механизмов и закономерностей начальных этапов развития патологии делает возможным использование эффективных патогенетических методов лечения и профилактики патологических состояний. Многочисленные исследования свидетельствуют, что при формировании болезни, в первую очередь, наблюдаются нарушения белкового обмена, снижается биологическая активность протеинов, тесно связанная с пространственной организацией белковых макромолекул [1, 2]. Поэтому интегральное определение структурно-метаболической активности белков имеет большое значение в ранней диагностике, патогенетической терапии, разработке прогностических критериев выздоровления и реабилитации. Перспективным в этом направлении является использование люминесцентного метода, особенно исследование фосфоресценции, отражающей функциональную активность белков, их стабильность, внутримолекулярную подвижность, структурный уровень компактной организации протеинов [2–4]. Фосфоресценция – это особый вид люминесценции, который в отличие от флуоресценции характеризуется тем, что молекула вещества излучает поглощенную энергию в виде квантов света не сразу, а на протяжении длительного времени до 10^{-3} с. Большое время ремиссии связано с запрещенными энергетическими переходами в квантовой биофизике. В отличие от флуоресценции, при которой выполняются относительно быстрые реакции, фосфоресцирующие субстраты «абсорбируют» световую энергию и задерживают ее больше, а внутриатомные реакции, переизлучая

накопленную энергию, происходят значительно медленнее. Переход молекулы в возбужденное состояние за счет поглощения света может иметь излучательную способность при синглет-триплетных взаимодействиях. Время жизни возбужденного состояния при фосфоресценции составляет порядка 10^{-2} – 10^{-4} с в отличие от флуоресценции, для которой время жизни возбужденного состояния составляет 10^{-7} – 10^{-8} с. Атом, поглощающий квант возбужденного излучения, переходит из основного в энергетический уровень, что отвечает основной электронной конфигурации, на высший энергетический уровень S_1 (S_2), соответствующий возбужденным электронным конфигурациям. Уровни S_0 , S_1 , S_2 называются синглетными – переход между ними совершается без изменения ориентации спина электрона. Время жизни молекулы в возбужденном состоянии S_1 или S_2 составляет $\sim 10^{-8}$ с. Переход в основное энергетическое состояние может осуществляться за счет безизлучательных переходов или с излучением квантов флуоресценции (коротковолновое послесвечение). С определенной вероятностью возможно также вращение спина возбужденного электрона, то есть безизлучательный переход молекулы из возбужденного синглетного в возбужденное триплетное T-состояние. Переход молекулы из триплетного в основное состояние $T \rightarrow S_0$ запрещенный по спину (в соответствии с принципом Паули). Таким образом, триплетный уровень есть метастабильным. В силу малой вероятности перехода $T \rightarrow S_0$ молекула находится в триплетном состоянии достаточно долго ($\sim 10^{-4}$ – 10^{-3} с). Переход $T \rightarrow S_0$ происходит лишь в результате предварительного перехода электрона с уровня T на вышерасположенный уровень S_3 (этот переход совершается за счет энергии теплового движения молекул), а после электрон с излучением кванта света возвращается в состояние S_0 (переход, разрешенный правилами

отбора). Излучение по такому механизму называется фосфоресценцией [4–7]. То есть это такое излучение, когда молекула, имеющая два неспаренных электрона (триплетное состояние), переходит в состояние, при котором все электроны спарены (синглетное состояние). С точки зрения химии появление неспаренного электрона является ничем иным, как образованием в молекуле валентности. Такие молекулы легко вступают в химические реакции и представляют собой свободные радикалы, которым свойственна высокая реакционная способность вести цепные реакции окисления липидов, белков, нуклеиновых кислот и других биологических субстратов. Они играют важную роль при образовании квантовых сшивок в ДНК, между ДНК и белками, а также другими макромолекулами.

Учитывая высокую чувствительность и информативность, фосфоресценция позволяет определить наличие патологии на уровне изучения электронных возбужденных состояний молекул, фотохимических реакций, динамики быстрых молекулярных переходов, структуры и свойств химических и биологических систем. Множественные исследования свойств белков при развитии метаболических нарушений указывают на качественные их отличия от белков соответствующих нормальных тканей. По мере развития патологии все больше проявляются особенности и различия белкового обмена и их конформационной компактной структуры. Исследования убеждают в том, что изменения качественных свойств белков всегда сопряжены с нарушением таких их основных функций, как ферментативная, гормональная, рецепторная, транспортная, структурная, механическая, опорная, резервная, субстратно-энергетическая, сократительная, электроосмотическая, энерго-трансформирующая, когенетическая, генно-регуляторная, иммунологическая, антиоксидантная, обезвреживающая и гемостатическая. Важное значение в формировании функциональной активности белков принадлежит пространственной структуре полипептидных цепей, обусловленной образованием углеводных связей, электростатических сил и неполярным Ван-дер-ваальсовым взаимодействиями. Это позволяет белкам сворачиваться в уникальное компактное высокоорганизованное и функционально активное метаболическое

состояние. Разнообразные вредные физические, химические, биологические факторы, токсические продукты обмена веществ способны изменять конформационные свойства белковых молекул и их функциональную активность. Поэтому исследование процессов, связанных с изменением структурной активности белков, имеет не только теоретическое, но и прогностическое практическое значение в медицинской практике.

Перспективным методическим подходом для ранней диагностики функциональной активности белков сыворотки крови может быть измерение интегральной интенсивности фосфоресценции сыворотки крови [2]. Известно, что природными хромофорами белков являются тирозиновые и триптофановые остатки аминокислот, высвобождающиеся в условиях потери компактной высокоорганизованной структуры белковой молекулы. Многочисленными исследованиями было доказано, что белки в водных растворах практически не дают фосфоресценцию. Это обусловлено тем, что основным механизмом гашения возбужденных триплетных состояний при фосфоресценции есть наличие в растворах кислорода и воды. При таких условиях не достигается необходимой для возникновения фосфоресценции, прочности микроокружения триптофановых и тирозиновых аминокислотных остатков. Фосфоресценция белков имеет место в тех случаях, когда их хромофоры пребывают в микроокружении с высокой жесткостью. Увеличение внутримолекулярной динамики повышает безизлучательную дезактивацию триплетных состояний, обусловленную непланарной деформацией индольного и фенольного колец (триптофана и тироксина) за счет их соударений с окружающими конструктивными элементами белковой глобулы. Выраженная зависимость значений квантового выхода и времени гашения фосфоресценции от молекулярной подвижности окружения хромофоров и соответственно от времени низкочастотных флуктуаций структуры макромолекул белков позволяет использовать фосфоресценцию для изучения внутримолекулярной подвижности белков.

Известно, что агрегация белков, потеря компактной структурно-функциональной организации приводят к существенному повышению жесткости микроокружения триптофановых остатков, что сопряжено с

повышением интенсивности фосфоресценции. Усиление интенсивности фосфоресценции при инактивации и потере компактной структуры белков наблюдается при их разворачивании и приобретении первичной структуры в условиях денатурации полипептидных цепей и потере биологической активности протеинов [3, 4, 5, 7].

Существенное влияние на характеристику триптофановой фосфоресценции может иметь локализация в непосредственной близости от индольного кольца триптофанового остатка, боковых радикалов некоторых аминокислот, обладающих свойствами гасителей электронных возбужденных состояний фосфоресценции. Наибольшей способностью ингибировать триптофановую фосфоресценцию обладают боковые остатки серосодержащих аминокислот – цистеина, цистина, метионина, а также тирозина и триптофана. Гашение фосфоресценции боковыми группами этих аминокислот возможно, если расстояние между индольными кольцами и группами подавления фосфоресценции коррелирует с размерами взаимодействия Ван-дер-ваальсового радиуса, не превышающего нескольких ангстрем. Исключительная роль в эффектах молекулярного гашения электронных возбужденных состояний принадлежит дисульфидным и сульфгидрильным группам. Выраженная их способность к подавлению фосфоресценции объясняется возможностью принятия ими электрона от триптофана в возбужденном триплетном состоянии. Внутримолекулярное гашение может осуществляться не только при перманентном контакте индольного кольца с боковыми группами остатков аминокислот, но и в момент их относительно кратковременных контактов, которые возникают вследствие флуктуации структуры белка. Значительное большинство белков в водных растворах в миллисекундном и секундном диапазонах не фосфоресцируют при комнатной температуре. Это обусловлено, в первую очередь, высокой эффективностью динамического гашения фосфоресценции хромофоров. Повышение жесткости структуры белков, не способных к фосфоресценции вследствие перехода их из раствора в твердое агрегатное состояние во всех случаях, приводит к возникновению хорошо регистрируемой фосфоресценции и сопровождается увеличением в десятки раз квантового выхода и времени затухания

фосфоресценции. Твердым агрегатным состоянием белков могут быть их пленки и кристаллы. Существенное увеличение, в несколько раз, интенсивности триптофановой фосфоресценции свидетельствует о снижении внутримолекулярной подвижности белков в местах локализации остатков триптофана, способных к фосфоресценции. Причиной такого повышения жесткости микроокружения триптофановых остатков является стабилизация структуры белка в инактивированном состоянии, сопряженного с разворачиванием макроструктуры полипептидных цепей. Увеличение интенсивности фосфоресценции отражает процесс образования инактивированного белка при существенном разворачивании компактной структуры. Исследования свидетельствуют, что сворачивание и разворачивание полипептидных цепей молекулы белка тесно связаны с интенсивностью триптофановой фосфоресценции, которая отражает функциональную активность макромолекулы протеинов, их жесткость, внутримолекулярную подвижность, структурно-функциональный уровень компактных структур, что может быть использовано при изучении влияния вредных факторов на организм, диагностике степени тяжести заболевания, прогнозировании выздоровления больных и обосновании патогенетических механизмов развития многих метаболических нарушений.

Целью работы являлось изучение влияния простых полиэфиров в условиях субтоксического длительного воздействия на показатели интенсивности фосфоресценции сыворотки крови белых крыс и определение ее прогностического значения.

Материалы и методы

Программа исследования предусматривала определение интенсивности фосфоресценции сыворотки крови животных, подвергавшихся пероральному воздействию эпоксидсодержащими олигоэфирами в дозах 1/10; 1/100 и 1/1000 ДЛ₅₀ на протяжении 45 суток. В работе использованы новые вещества, имеющие товарное название «Лапроксиды»: триглицидиловый эфир полиоксипропилен-триола молекулярной массы 303 (Л-303) и этиленгликольпропиленэпоксид молекулярной массы 500 (Л-500). На основании параметров острой токсичности данная группа соединений относится к малотоксичным

веществам (4-й класс опасности), не обладающим кумулятивными свойствами. Среднесмертельные дозы (ДЛ₅₀) на белых крысах были установлены на уровнях 26,7 и 5,75 г/кг массы животного. Водные растворы веществ в указанных дозах вводились внутривентрикулярно с помощью металлического зонда до кормления животных. Контрольная группа получала соответствующие объемы питьевой воды. Все этапы эксперимента выполнялись в соответствии с правилами гуманного отношения к животным и требованиями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются в научном эксперименте» (Страсбург, 1986).

Исследуемые ксенобиотики нашли широкое применение для получения пластмасс, эпоксидных смол, эмалей, лаков, красок, пенопластов и др. Отсутствие прогностической характеристики потенциальной опасности лапроксидов для теплокровных животных и человека послужило основанием изучения патофизиологических механизмов развития структурно-метаболических нарушений в условиях длительного субтоксического воздействия на организм.

Определение интенсивности люминол-зависимой фосфоресценции сыворотки крови выполнялось после возбуждения ее источником света спектрофлуориметрическим методом следующим образом: на кварцевую пластину размером 5x45 мм наносили 50 мкл сыворотки крови и 10 мкл 3 % раствора люминола, после чего пластину помещали в термостат. При температуре 30 °С образцы сыворотки крови высушивались на протяжении 20 минут с образованием твердой пленки, затем помещались в фосфороскоп люминесцентного комплекса, и измерялась интенсивность фосфоресценции. Источником возбуждающего света была ртутная лампа ДРК-120. С помощью монохроматора ДМР-4 выделяли спектральные линии с такими длинами волн: $\lambda_{\text{возб}} = 297, 313, 334, 365, 404$ и 434 нм. Кванты света поглощались пленкой сыворотки крови с дальнейшим излучением квантов фосфоресценции, регистрировавшихся с помощью фотоэлектронного умножителя (ФЭУ-130). В основу изучения интенсивности фосфоресценции сыворотки крови были положены методические рекомендации МЗ Украины «Визначення інтегральної

інтенсивності фосфоресценції протеїнів сироватки крові як прогностичної основи ранньої діагностики онкопатології і ступеня тяжкості перебігу захворювання» (Київ, 2011). Для статистическої оцінки групових різниць використовували параметричний t-критерій Стьюдента-Фішера.

Результаты

Исследование интенсивности люминол-зависимой фосфоресценции сыворотки крови при длине волны возбуждения $\lambda = 297$ нм выявило увеличение интенсивности фосфоресценции на 64,29 и 117,52 %, соответственно под влиянием 1/100 и 1/10 ДЛ₅₀ лапроксида Л-303 (табл. 1). Интенсивность фосфоресценции сыворотки крови при длине волны возбуждения $\lambda = 313$ нм повышалась в меньшей мере. Ее уровни усиливались при этой длине возбуждения на 43,45 и 77,99 %, соответственно у групп животных, подвергавшихся в подостром опыте пероральному воздействию 1/100 и 1/10 ДЛ₅₀. Возбуждение сыворотки крови монохроматическим светом $\lambda = 334$ нм обнаружило увеличение в 1/100 ДЛ₅₀ интенсивности свечения на 23,34 и в 1/10 ДЛ₅₀ на 39,36 % по сравнению с уровнем группы контрольных животных. Оценка интенсивности фосфоресценции сыворотки крови при $\lambda_{\text{возб}} = 365$ нм выявила усиление интенсивности фосфоресценции на 63,08 и 81,43 % соответственно у белых крыс, подвергавшихся воздействию 1/100 и 1/10 ДЛ₅₀. Значительное усиление интенсивности фосфоресценции отмечалось при длинах волн возбуждающего света $\lambda = 404$ нм, $\lambda = 434$ нм. Так, при $\lambda_{\text{возб}} = 404$ нм интенсивность фосфоресценции сыворотки крови повышалась на 268,0 и 312,21 %, при $\lambda_{\text{возб}} = 434$ нм – на 215,96 и 259,99 % соответственно у групп животных, подвергавшихся воздействию 1/100 и 1/10 ДЛ₅₀. Вместе с тем следует отметить, что монохроматические длины волн возбуждения сыворотки крови ($\lambda = 297, 313, 334, 365, 404$ и 434 нм) у группы животных, подвергавшихся пероральному воздействию 1/1000 ДЛ₅₀, практически не влияли на уровень интенсивности фосфоресценции по сравнению с контролем.

Динамика интенсивности фосфоресценции сыворотки крови экспериментальных животных подтверждает, что в сложной многокомпонентной системе присутствуют

реакционноспособные молекулы с высоким уровнем электронных возбужденных состояний. Эти данные свидетельствуют также о том, что лапроксид Л-303 в условиях подострого воздействия в 1/10 и 1/100 ДЛ₅₀ приводит к значительной внутримолекулярной перестройке белков, изменению их конформационных свойств и компактной структуры, сопряженных с накоплением в сыворотке крови большого количества молекул, находящихся в триплетном возбужденном состоянии. Энергия этих молекул используется на образование тепла, безизлучательные переходы, передачу энергии другим молекулам, фотохимические реакции, а также излучение кванта фосфоресценции.

Изучение влияния лапроксида Л-500 на показатели интенсивности фосфоресценции сыворотки крови обнаружило повышение ее

уровней при всех исследуемых спектральных длинах волн возбуждения: 297, 313, 334, 365, 404 и 434 нм. Анализ спектральных длин волн возбуждения обнаружил сходную динамику интенсивности фосфоресценции, была обнаружена при воздействии Л-303. Так, Л-500 при длине волны возбуждения 297 нм увеличивал интенсивность фосфоресценции на 64,55 и 115,7 %, при 313 нм – на 48,29 и 81,06 %, при 334 нм – на 21,6 и 37,93 %, при 365 нм – на 62,43 и 80,4 %, при 404 нм – на 269,76 и 310,07 %, при 434 нм – на 218,41 и 261,61 %, соответственно под воздействием 1/100 и 1/10 ДЛ₅₀. Лапроксид Л-500 в дозе 1/1000 ДЛ₅₀ не влиял на интенсивность фосфоресценции сыворотки крови в условиях субтоксического воздействия (табл. 2).

Таблица 1

Влияние лапроксида Л-303 в субтоксических дозах на показатели интенсивности фосфоресценции сыворотки крови в условиях подострого эксперимента

Длина возбуждающего (λ _{возб} нм)	волны света	Группа наблюдения, интенсивность фосфоресценции (имп/с), M ± m, доза ДЛ ₅₀			
		Контроль (n = 10)	1/10 (n = 10)	1/100 (n = 10)	1/1000 (n = 10)
297		3187,2 ± 65,4	6932,8 ± 54,3*	5236,4 ± 73,8*	3246,5 ± 73,2
313		305,8 ± 12,3	544,3 ± 18,7*	438,7 ± 21,4*	343,6 ± 35,8
334		643,4 ± 26,5	896,7 ± 25,4*	793,6 ± 32,4*	682,7 ± 44,6
365		1738,7 ± 43,6	3154,6 ± 53,7*	2835,6 ± 48,4*	1784,3 ± 52,7
404		518,3 ± 22,4	2136,5 ± 42,3*	1907,4 ± 37,5*	548,2 ± 33,6
434		576,2 ± 24,8	2074,3 ± 35,8*	1820,6 ± 29,4*	594,6 ± 28,5

* Различия достоверные p ≤ 0,05

Таблица 2

Влияние лапроксида Л-500 в субтоксических дозах на показатели интенсивности фосфоресценции сыворотки крови в условиях подострого эксперимента

Длина волны возбуждающего света ($\lambda_{\text{возб}}$ нм)	Группа наблюдения, интенсивность фосфоресценции (имп/с), $M \pm m$, доза ДЛ ₅₀			
	Контроль (n = 10)	1/10 (n = 10)	1/100 (n = 10)	1/1000 (n = 10)
297	3187,2 ± 65,4	6875,4 ± 42,6*	5244,6 ± 68,2*	3205,7 ± 84,3
313	305,8 ± 12,3	553,7 ± 21,6*	453,5 ± 23,7*	324,5 ± 31,8
334	643,4 ± 26,5	887,5 ± 20,3*	782,4 ± 29,5*	676,4 ± 38,6
365	1738,7 ± 43,6	3136,7 ± 48,2*	2824,3 ± 43,7*	1775,8 ± 47,4
404	518,3 ± 22,4	2125,4 ± 39,7*	1916,5 ± 26,8*	536,4 ± 24,5
434	576,2 ± 24,8	2083,6 ± 30,5*	1834,7 ± 23,5*	583,7 ± 31,2

* Различия достоверные $p \leq 0,05$

Обсуждение

Определение высоких уровней интенсивности фосфоресценции сыворотки крови в ультрафиолетовой и видимой областях спектра света указывает на изменение конформационных свойств белковых молекул, связанных с окислительной модификацией протеинов и развитием мембранной патологии. Структурная перестройка белков обусловлена потерей компактной организации макромолекулы, высвобождением фосфоресцирующих аминокислотных остатков тирозина и триптофана. Это свидетельствует о нарушении структурно-функциональной организации белков сыворотки крови, белков-ферментов, белков-гормонов и др. Длина волны возбуждения $\lambda_{\text{возб}} = 404$ нм, на которой отмечались наиболее высокие отличия в уровнях фосфоресценции между опытными и контрольными группами, отвечает максимуму спектра поглощения гемоглобина и может указывать на потерю этим белком компактной структуры и функциональной активности, что может быть следствием развития тканевой гипоксии и мембранной патологии. Повышение у видимой спектральной области света ($\lambda = 404$ – 434 нм) интенсивности фосфоресценции сыворотки крови может указывать на увеличение в ней уровня внеэритроцитарного гемоглобина, нарушение его конформационных свойств, а также увеличение содержания геминов ($\lambda_{\text{возб}} = 404$ нм). Эти данные позволяют судить о том, что лапроксид Л-303 потенцирует

развитие свободнорадикальной мембранной патологии, которая может лежать в основе формирования гипохромной анемии и мембранной патологии. Известно, что фотоны ультрафиолетового спектра света поглощаются в основном ароматическими аминокислотами (тирозин $\lambda_{\text{погл}} = 280$ нм, триптофан $\lambda_{\text{погл}} = 230$ нм), белками ($\lambda_{\text{погл}} = 280$ – 300 нм), нуклеиновыми кислотами и нуклеотидами ($\lambda_{\text{погл}} = 260$ нм). Повышение интенсивности фосфоресценции сыворотки крови при спектральных волнах возбуждения 297 и 313 нм может указывать на увеличение в сыворотке крови вышеуказанных макромолекул и потерю ими структурно-функциональных свойств. Увеличение фосфоресценции сыворотки крови экспериментальных животных может свидетельствовать о существенном снижении внутримолекулярной подвижности белков в местах локализации остатков триптофана, тирозина. Причиной такого повышения жесткости микроокружения триптофановых остатков является стабилизация структуры белка в инактивированном состоянии, сопряженного с разворачиванием макроструктуры полипептидных цепей, отражающая функциональную активность белков сыворотки крови.

Выводы

1. Результаты изучения влияния лапроксидов Л-303 и Л-500 обнаружили существенное усиление интенсивности фосфоресценции сыворотки крови у групп

животных, подвергавшихся пероральному воздействию ксенобиотиками в дозах 1/10 и 1/100 ДЛ50 при спектральных линиях возбуждающего света 297, 313, 334, 365, 404 и 434 нм.

2. В 1/1000 ДЛ50 вещества не оказывали влияния на показатели интенсивности фосфоресценции сыворотки крови.
3. Наличие высоких уровней интенсивности фосфоресценции свидетельствует о том, что лапроксиды в субтоксических дозах 1/10 и 1/100 ДЛ50 потенцируют образование значительного количества реакционноспособных молекул, обладающих свойствами вести цепные реакции окисления липидов, белков, нуклеиновых кислот и других биологических субстратов.
4. Исследуемые соединения способны изменять конформационные свойства протеинов, нуклеиновых кислот и нуклеотидов, а также их функциональную активность, в основе чего лежит формирование свободнорадикальной мембранной патологии.

References (список литературы)

1. Bagnich SA, Melnichenko IM, Poddenezhnyi EN. [The effect of matrix on aromatic compounds phosphorescence in porous sol-gel glasses]. *Optics and Spectrum*. 1995;79(6):936–941.
2. Zaytseva OV, Zhukov VI, Perepadya SV, Moiseenko AS, Vinnik Yu.A. [Investigation of phosphorescence in patients with colorectal cancer and its diagnostic significance]. *Visnyk Problem Biologii i Medytsyny*. 2010;3:136–141.
3. Levshin LV, Saletskiy AM. *Lyuminestsentsiya i ee izmereniya. Molekulyarnaya lyuminestsentsiya* [Luminescence and its dimensions. Molecular luminescence]. Moscow: Moscow State University Publ., 1989. 272 p.
4. Letuta SN, Maryahina VS. [Kinetics of delayed fluorescence as a method of breast cancer diagnosis]. *VI Mezhdunarodnaia. nauchno-tehnicheskaiia konferentsiia. "Aktualnyie voprosyi teoreticheskoy i prikladnoy biofiziki, fiziki i himii"* [Proceedings of the 6th International scientific technical conference "Relevant issues of theoretical and applied biophysics, physics and chemistry"]. Sevastopol, 2010, pp. 222–224. (In Russian).
5. Mazhul VM, Zaitseva EM, Shavlovsky MM, Povarova OI, Kuznetsova IM, Turoverov KK. [Room temperature phosphorescence of amorphous aggregates and amyloid fibrils resulting from protein misfolding]. *Tsitologiya*. 2005;47(11):978–987.
6. Mironov AF. [Photodynamic cancer therapy: a novel effective method for the malignant tumors diagnostics and treatment]. *Sorosovskiy Obrazovatelnyiy Zhurnal*. 1996;8:32–39.
7. Rekharsky EM, Polenova TV, Borzenko AG. [Phosphorescence of some naphthalene derivative drugs in water media]. *Vestnik Moskovskogo Universiteta. Khimia*. 2004;45(2):112–116.

(received 01.07.2014, published online 15.10.2014)

(получено 01.07.2014, опубликовано 15.10.2014)

