

**ДЕФИЦИТ ФЕРМЕНТАТИВНОГО КОМПОНЕНТА АНТИОКСИДАНТНОЙ
ЗАЩИТЫ И ЕГО ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ВЛИЯНИЕ НА РАЗВИТИЕ ГИБЕЛИ КРЫС
ПРИ ОСТРОМ ИНГАЛЯЦИОННОМ ОТРАВЛЕНИИ ПУЛЬМОНОТОКСИКАНТОМ
ТЯЖЕЛОЙ СТЕПЕНИ**

Коньшаков Ю.О., Устинова Т.М., Гусак Т.И., Венгерович Н.Г.

Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины

Министерства обороны Российской Федерации

195043, г. Санкт-Петербург, ул. Лесопарковая, д.4

Резюме.

Цель – изучить динамику изменения активности глутатионпероксидазы в остром периоде отравления перфторизобутиленом в токсодозе LC_{50} в эксперименте и на основании полученных результатов обосновать модель прогноза вероятности наступления гибели. *Методы:* моделирование ингаляционного отравления перфторизобутиленом осуществляли путем статической заправки в течение 10 минут в токсодозе 1 LC_{50} ($1,46 \pm 0,21$ мг×мин/л). Глутатионпероксидазу исследовали через 30, 60, 120 и 360 минут после окончания ингаляционного воздействия. Фермент исследовали с использованием спектрофотометрической методики, основанной на определении величины убыли восстановленного глутатиона в среде инкубации при восстановлении перекиси водорода глутатионпероксидазой. При разработке прогностической модели применяли методику простой логистической регрессии. Для определения наличия связи между уровнем активности глутатионпероксидазы и гибелью животных использовали метод непараметрического корреляционный анализа с ранговой корреляцией по Кендаллу. *Результаты:* по проведенным исследованиям показана корреляция между низким уровнем активности глутатионпероксидазы и последующей гибелью животных. Зависимость была подтверждена между 87,5 % сравниваемых пар показателей. Была разработана математическая модель прогнозирования гибели крыс используя в качестве предиктора лабораторный показатель уровня антиоксидантного фермента в остром периоде отравления перфторизобутиленом.

Заключение: установлено значимое снижение активности глутатионпероксидазы крови при остром ингаляционном отравлении перфторизобутиленом тяжелой степени. Доказана высокая (более 80 %) корреляция между снижением концентрации антиоксидантного фермента и последующей гибелью отравленных животных.

Ключевые слова: перфторизобутилен; активность глутатионпероксидазы; статическая ингаляция; логистическая регрессия; пульмонотоксикант; отёк легких

**ANTIOXIDANT DEFENCE ENZYMATIC COMPONENT'S DEFICIENCY AND ITS
PROGNOSTIC IMPACT ON RAT DEATH EVOLUTION IN ACUTE INHALATION
SEVERE POISONING WITH A PULMONOTOXICANT**

Kon'shakov Yu.O., Ustinova T.M., Gusak T.I., Vengerovich N.G.

*State Scientific Research Testing Institute of Military Medicine of the Ministry of Defense of the
Russian Federation, 195043, Saint Petersburg, Lesoparkovaya street, 4*

Summary. Purpose: to study the dynamic pattern in glutathione peroxidase activity in the acute phase of perfluoroisobutylene poisoning at a toxic dose of LC_{50} in experiment, and to substantiate the death probability prediction model in accordance with the obtained results. *Methods:* modeling of inhalation poisoning with perfluoroisobutylene was carried out by static seeding for 10 minutes at a toxic dose of 1 LC_{50} ($1,46 \pm 0,21 \text{ mg} \times \text{min/l}$). Glutathione peroxidase was evaluated 30, 60, 120 and 360 minutes post inhalation exposure. The enzyme was studied using a spectrophotometric technique based on determining the loss value of reduced glutathione in the incubation medium during the reduction of glutathione peroxidase hydroperoxides. The simple logistic regression technique was used in the prediction model development. The non-parametric method of correlation analysis with Kendall rank correlation was used to confirm a relationship between the glutathione peroxidase activity level and the animals' death. *Results:* studies have shown a correlation between low levels of glutathione peroxidase and the subsequent animals' death. The relationship was confirmed between 87,5% of the indicator pairs being compared. A mathematical rat death prediction model was developed using the antioxidant enzyme laboratory value in the acute phase of perfluoroisobutylene poisoning as a predictor. *Conclusion:* there was a significant decrease in blood glutathione peroxidase activity was found in acute inhalation poisoning with severe perfluoroisobutylene. A high (more than 80%) correlation between the antioxidant enzyme glutathione peroxidase's concentration decrease and the subsequent death of poisoned animals has been proven.

Key words: perfluoroisobutylene; glutathione peroxidase activity; static inhalation; logistic regression; pulmonotoxicant; pulmonary edema

Введение. Современная антропогенная деятельность неразрывно связана со значительным ростом промышленного синтеза технических и бытовых полимерных изделий, различных хладагентов, конструкционных и строительных материалов, а также необходимостью их переработки и утилизации. Особое место в этом перечне занимают высокомолекулярные полимеры [1, 2, 3]. Это обуславливает все более возрастающую потребность в утилизации полимерных (в том числе пластиковых) отходов, в процессе

которой до сих пор применяют такие методы как захоронение в почву и сжигание. Известно, что процесс горения пластмасс, возникающий как при пожарах, так и при нарушении технологии утилизации, может сопровождаться их пиролизом при достаточно высокой температуре, что неизменно ведет к высвобождению различных высокотоксичных летучих соединений. В частности, одним из наиболее известных из подобных соединений следует считать продукт пиролиза политетрафторэтилена или октафторциклобутана – перфторизобутилен. Данное вещество представляет собой перфторированный олефин, который в десять раз более токсичен, чем фосген [4].

Пульмонотоксичность перфторизобутилена проявляется при его ингаляционном воздействии и связана, по-видимому, как с ранним повреждением легочной ткани в результате развития оксидативного стресса, так и с последующей гипервоспалительной реакцией в результате активации полиморфноядерных лейкоцитов и легочных макрофагов [5, 6, 7].

Роль оксидативного стресса в раннем инициировании комплекса патологических изменений при ингаляционном отравлении перфторизобутиленом, ведущего к проявлению токсического отека легких и последующей гибели, подтверждается исследованиями протективного действия эфиров цистеина и динамикой уровня концентрации легочного глутатиона. Так, при ингаляционном отравлении крыс перфторизобутиленом в токсодозе LC_{50} наблюдалось снижение концентрации легочного глутатиона более чем на 25 %, а экзогенное повышение концентрации цистеина в плазме крови и интерстициальной жидкости ткани легкого позволило предупредить гибель крыс при ингаляционном отравлении перфторизобутиленом в абсолютно смертельной концентрации [8, 9].

Анализ изменений в ферментативной и неферментативной антиоксидантной системе организма при поражении веществами пульмонотоксического действия открывает широкие перспективы как для оценки эффективности средств неспецифической коррекции отравлений, так и для прогнозирования развития последствий этих отравлений. Особую роль в этом направлении играет система глутатиона, а в частности один из ее ключевых компонентов – фермент глутатионпероксидаза. Данный селенсодержащий фермент в комплексе с другими антиоксидантными ферментами обеспечивает основной механизм противоперекисной активности, а изменение его концентрации отражает эффективность работы антиоксидантной системы организма [10, 11], что делает ее ключевой предикторной переменной для построения прогностической модели предсказания наступления летального исхода при отравлении веществами пульмонотоксического действия.

Цель исследования. Изучение динамики изменения активности глутатионпероксидазы в остром периоде отравления перфторизобутиленом в токсодозе LC_{50} в эксперименте и

обоснование модели прогноза вероятности наступления гибели на основании полученных результатов.

Материалы и методы. Исследование выполнены на белых нелинейных крысах-самцах массой 200-240 г (питомник Рапполово, Ленинградская область). Животных содержали в надлежащих условиях вивария (разрешение главного государственного ветеринарного инспектора Санкт-Петербурга № 78-1102/19, сертификат ISO 9001:2015 № ST.RU.0001.M0017187, сертификат соответствия стандарту GLP № GLP-0727-1020). Сбор материала для исследований и эвтаназию животных осуществляли путем декапитации.

Моделирование острого ингаляционного отравления перфторизобутиленом осуществляли путем статической затравки в герметичной камере объемом 220 литров в течение 10 минут в токсодозе 1 LC₅₀ (1,46±0,21 мг×мин/л).

Для исследования активности глутатионпероксидазы крови у крыс, ее забор осуществляли из хвостовой вены в объеме 500 мкл в пробирку с раствором гепарина (соотношение гепарин/цельная кровь 1/9). После забора крови животным вводили внутривенно физиологический раствор в объеме, соответствующему объему забранной крови. Одномоментный забор крови у крыс составлял 3,2 % от объема циркулирующей крови. Данный объем кровопотери, по нашему мнению, не оказывает значимого влияния на динамику исследуемого показателя. Глутатионпероксидазу оценивали через 30, 60, 120 и 360 минут после отравления пульмонотоксикантом.

Измерение активности глутатионпероксидазы выполняли по спектрофотометрической методике [12], используя перекись водорода в качестве субстрата. Принцип метода заключался в утилизации глутатионпероксидазой восстановленного глутатиона при инкубации цельной крови с перекисью водорода. По образованию окрашенного продукта с реактивом Элмана проводили определение содержания восстановленного глутатиона в пробах до и после инкубации.

Ход определения. В пробирку отбирали 0,5 мл гепаринизированной крови и добавляли 3,5 мл дистиллированной воды, тщательно перемешивали и оставляли на 10-15 минут при температуре 2-8 °С для полного гемолиза. Далее в пустую пробирку приливали 1 мл раствора, восстановленного глутатиона (31,88 мМ) и к ней добавляли 1 мл охлажденного гемолизата. Полученную смесь переносили по 0,5 мл в две центрифужные пробирки (опытная и контрольная пробирка) и инкубировали в течение 5 минут на водяной бане при 37 °С. В опытную пробирку добавляют 0,1 мл раствора перекиси водорода (13,8 мМ), интенсивно встряхивали и оставляли на водяной бане. Через минуту с момента добавления раствора пероксида водорода в опытную и контрольную пробирки приливают по 2 мл холодной 10 % трихлоруксусной кислоты. После проделанных стадий в контрольную пробу

добавляют 0,1 мл раствора пероксида водорода. Обе пробирки встряхивали и помещали охлаждаться на 10 минут в холодильник. Далее пробы центрифугировали в течение 15 минут при 3000 об/мин при 0-4 °С (Eppendorf Centrifuge 5804 R, Германия). Надосадочную жидкость в объеме 0,5 мл из контрольной и опытных пробирок переносят в пробирки и к ним последовательно приливали 10 мл 0,3 М фосфатного буфера, рН 8,0 и 0,05 мл 10 мМ раствора реактива Элмана, тщательно перемешивали. Измерение оптической плотности контрольной пробы по сравнению с опытной проводили в кювете с ходом луча 10 мм при 412 нм.

Активность глутатионпероксидазы крови рассчитывают по форме:

$$A = \frac{(E_0 - E_k) \times 10,55 \times 10^6 \times 166,4}{13100} \quad (1)$$

где:

A – активность фермента в мкМ восстановленного глутатиона/(л×мин);

E₀ – оптическая плотность контрольной пробы по сравнению с опытной при ферментативном окислении глутатиона;

E_к – оптическая плотность контрольной пробы по сравнению с опытной при неферментативном окислении глутатиона;

10,55 – конечный объем пробы, мл;

166,4 – фактор разведения;

10⁶ – пересчет мМ в мкМ;

13100 – коэффициент молярной экстинкции ТНФА.

Статистический анализ результатов выполняли с помощью пакета программ Statistica 10. Проводили проверку нормальности распределения данных с использованием критерия Шапиро-Уилка. Для сравнения центральных параметров связанных выборок использовали непараметрический критерий Вилкоксона.

При разработке прогностической модели применяли методику простой логистической регрессии. Для определения наличия связи между уровнем активности глутатионпероксидазы и гибелью животных использовали метод непараметрического корреляционный анализа с ранговой корреляцией по Кендаллу. Критическое значение уровня статистической значимости при проверке нулевых гипотез принимали равным 0,05. В случае превышения достигнутого уровня значимости статистическим критерием этой величины принимали нулевую гипотезу.

Результаты и обсуждение. Изменения активности глутатионпероксидазы в крови крыс в различные сроки острого периода отравления перфторизобутиленом в токсодозе LC₅₀ представлена в таблице 1.

Таблица 1.

Активность глутатионпероксидазы в плазме крови и гибель крыс в различные сроки после ингаляционного воздействия токсиканта в дозе LCt₅₀ (n=10, Med[Q25;Q75])

Показатель	Исходное значение	Срок регистрации после отравления перфторизобутиленом, мин				
		30	60	120	360	720
Активность фермента, нМ GSH/(л×мин)	19,5 [18,9;20,4]	16,5 [15,3;17,1]*	16,4 [15,5;17,7]*	13,8 [12,7;15,8]*	17,2 [15,7;18,6]	-
Гибель	(0/10)	(0/10)	(0/10)	(3/10)	(5/10)	(6/10)
Примечания:						
1. – в скобках указано количество погибших животных/общее количество животных в группе;						
2 – * - различия с показателями фоновых значений статистически значимо при p – 0,05.						

Снижение уровня глутатионпероксидазы в сравнении с фоновым показателем определили в первые 30 минут после поражения тяжелой степени. При этом, минимальная активность фермента ($70,8 \pm 4,6$ % от фонового показателя) регистрировали через 2 часа после воздействия пульмонотоксиканта.

Снижение активности данного фермента глутатионовой антиоксидантной системы в раннем периоде отравления перфторизобутиленом, по-видимому, обусловлено несколькими факторами. Одним из них может являться дефицит НАДФН, возникающий в результате реакции регенерации глутатиондисульфида до восстановленного глутатиона [13]. Также немаловажную роль играет истощение пула глутатионпероксидазы, содержащей «восстановленный» селенол в активном центре энзима за счет его окисления до селеновой кислоты с последующим образованием комплекса глутатионпероксидаза-глутатион на фоне оксидативного стресса [14].

Гибель 50 % животных регистрировали в диапазоне между 3 и 5 часами после ингаляционного воздействия перфторизобутиленом. Гибель одного животного была зафиксирована через 11 часов после начала эксперимента. При аутопсии погибших животных определялись классические морфологические признаки развившегося токсического отека легких: неравномерное уплотнение и полнокровие легочной ткани с обширными очагами субплевральных кровоизлияний и наличием пенистой геморрагической жидкости в просвете трахео-бронхиального дерева (рис.1).

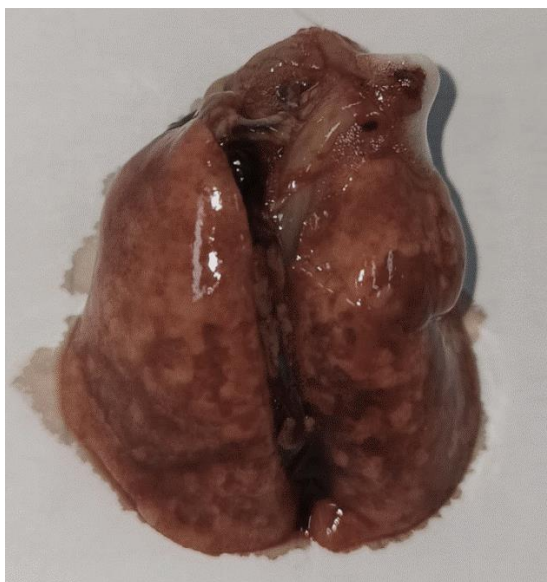


Рисунок 1 – Макропрепарат легких крыс через 3 часа после отравления перфторизобутиленом в токсодозе LC_{50}

Компенсаторное восстановление активности глутатионпероксидазы у выживших животных наблюдали спустя 6 часов после острого отравления перфторизобутиленом. В этот период ее концентрация составила $88,8 \pm 5,1$ % от среднего фонового показателя в группе.

При анализе уровня активности глутатионпероксидазы в каждом из наблюдений обращало на себя внимание достаточно прослеживаемая корреляция между низким уровнем фермента, определяемом на 120 минуте и последующей гибелью животного. Значение коэффициента ранговой корреляции Кендалла (t) составило $-0,75$ при уровне значимости $p < 0,005$, что свидетельствует о достаточно сильной значимой обратной связи между уровнем активности фермента и гибелью экспериментальных животных. Данная зависимость подтверждается между $87,5$ % сравниваемых пар показателей. Полученная закономерность позволила разработать математическую модель прогнозирования гибели крыс используя в качестве предиктора лабораторный показатель уровня антиоксидантного фермента в остром периоде отравления перфторизобутиленом. В результате ее реализации был получен коэффициент регрессии, характеризующий вероятность наступления гибели в зависимости от степени снижения активности глутатионпероксидазы через 2 часа после отравления пульмонотоксикантом – период выявления ее минимальной активности.

Вероятность гибели животного высчитывалась по формуле:

$$P = \frac{1}{1 + e^{-(b_0 + b_1 X)}}, \quad (2)$$

где e – основание натурального логарифма;

b_0 – константа модели;

b_1 – коэффициент при предикторной переменной

Рассчитанные коэффициенты регрессии представлены в таблице 2.

Таблица 2.

Расчётные коэффициенты логистической регрессии (n=10)

Свободный член (b0)	-150,9
Бета-вес показателя активности фермента (bi)	10,38
Значение p для модели в целом	0,002

Закключение. В результате проведенного исследования установлено значимое снижение активности глутатионпероксидазы в крови экспериментальных животных в остром периоде отравлении перфторизобутиленом тяжелой степени. Минимальное значение данного показателя регистрировали через 2 часа с момента отравления. Так же доказана высокая (более 80 %) корреляция между снижением концентрации антиоксидантного фермента – глутатионпероксидазы и последующей гибели отравленных животных. На основании полученных данных была составлена прогностическая модель наступления гибели крыс в зависимости от уровня снижения антиоксидантного фермента в остром периоде отравления пульмонотоксикантом. Полученные данные свидетельствуют о необходимости дальнейшего совершенствования неспецифических средств защиты за счет применения физиологически активных веществ с антиоксидантным и антигипоксантичным профилем.

Список литературы

1. Patocka J. Perfluoroisobutylene: Poisonous choking gas. *Vojenske zdravotnické listy*. 2019; 88(3): 98-105. <https://doi.org/10.31482/mmsl.2019.006>.
2. Зейфман Ю.В., Тер-Габриэлян Е.Г., Гамбарян Н.П., Ктунянц И.Л. Химия перфторизобутилена. *Успехи химии*. 1984; LIII(3):431-461.
3. Muir B., Cooper D.B., Carrick W.A. Analysis of chemical warfare agent III. Use of bis-nucleophiles in the trace level determination of phosgene and perfluorobutylene. *J Chromatogr A*. 2005; 1098(1-2): 156-165, <https://doi.org/10.1016/J.croma.2005.08070.epub2005oct 5>.
4. Zhang T., Zhang X., Shao Z., Ding R., Yang S., Ruan J., Sun X., Xu J., Huang C., Hu Z., Zhang X. The prophylactic and therapeutic effects of cholinolytics on perfluoroisobutylene inhalation induced acute lung injury. *J Occup Health*. 2005; 47(4): 277-85.
5. Zhang Y., Fan L., Xi R., Mao Z., Shi D., Ding D., Zhang Z., Wang X. Lethal concentration of perfluoroisobutylene induces acute lung injury in mice mediated via cytokine storm, oxidative stress and apoptosis. *Inhal Toxicol*. 2017; 29(6):255-265.

6. Тришкин Д.В., Чепур С.В., Толкач П.Г., Башарин В.А. Пульмонотоксичность продуктов горения синтетических полимеров. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2018; 4: 114-120.
7. Wang H., Ding R., Ruan J. and et.al. Perfluoroisobutylene-Induced acute lung injury and mortality are heralded by neutrophil sequestration and accumulation. *J. Occup Health*. 2001; 43: 331-338.
8. Lailey A.F., Hill L., Lawston I.W. and et.al. Protection by cysteine esters against chemically induced pulmonary oedema. *Biochemical Pharmacology*. 1991; 42(1): S47-S54.
9. Лопатко В.С. Предикторы развития токсического отека легких у лабораторных животных при интоксикации веществами пульмонотоксического действия. *Известия Российской Военно-Медицинской академии*. 2020; 39:53-59.
10. Нагиев Э.Р., Исмаилова Ф.Э., Нагиева С.Э. Активность глутатионпероксидазы головного мозга при лучевой болезни. *Проблемы экологической медицины*. 2019; 204-209.
11. Handy D.E., Lioscalso J. The role of glutathione peroxidase-1 in health and disease. *Free radical bio med*. 2022; 188: 146-161, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2022.06.004>.
12. Рецкий М.И., Шабунин С.В., Блиднецова Г.Н. Метод определения активности глутатионпероксидазы в крови. Методические положения по изучению процессов свободнорадикального окисления и системы антиоксидантной защиты организма. ГНУ Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии Россельхозакадемии.: Воронеж; 2010.
13. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. М. : Слово; 2006.
14. Чигринский Е.А., Конвай В.Д., Ефременко Е.С., Соснин М.И. Активность ферментов системы глутатиона в почках крыс при чрезмерных физических нагрузках. *Современные проблемы науки и образования*. – 2014. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=>