

histochemical techniques and scanning electron microscopy with X-ray diffraction. The average age of the dead persons with atherosclerotic aorta was  $68, 47 \pm 1, 32$  years, and in those having no signs of mineralization was  $51, 8 \pm 2, 56$  years. The equal number of men and women (both 30 patients) were selected for the study. During the macroscopic study of wall tissue, biomineral deposits were found to be located in the inner layer of the aortic wall in the case of atherosclerosis. Histological study has shown the thickening of fibrous layer and elastic fibers, focal lipid plaques, cholesterol fissures, oedema in the affected aortic components. The presence of calcium compounds in identified biominerals was confirmed by using histochemical staining by Alizarin Red and Von Kossa method. SEM with X-ray microanalysis has demonstrated mineralized elements in aortic tissue are detected as bright greyish-white objects in the form of blocks, clots, and fine powder particles, inlaid into histological structure of valves and closely related to connective tissue components of the organ. In some sites elastic and connective fibers foliation was observed, in other locations biomineral component smoothly turns into the surrounding stroma. X-ray diffraction of aortic mineralized components in all sites has showed a similar chemical composition, close to the ratio between calcium and phosphorus, most of which corresponds to hydroxyapatite.

УДК 616 - 099: 547. 593] - 036.11 - 092. 9

**Наконечна С.А., Гафт К.Л., Коцїй Є.Є., Наконечний Є.В.**

## **ВПЛИВ ПОХІДНИХ ФЕНОЛУ НА СПОЛУЧЕНІСТЬ ПРОЦЕСІВ МІКРОСОМАЛЬНОГО ОКИСНЕННЯ Й БІОЕНЕРГЕТИКИ В ХРОНІЧНОМУ ДОСЛІДІ НА ЛАБОРАТОРНИХ ТВАРИНАХ**

Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна  
ДУ «Харківський науково-дослідний інститут загальної  
та невідкладної допомоги НАМН України імені В.Т. Зайцева»

*У статті був описаний взаємозв'язок між активністю монооксигеназної системи та станом процесів ліпопероксидації у мікросомах печінки щурів при дії на організм похідних фенолу. Використовуючи методи диференційованого ультрацентрифугування, спектрофотометрії та хемілюмінесцентного аналізу, визначено активність НАДФ-цитохром-с-редуктази, вміст цитохромів b<sub>5</sub> та P-450, диєнових кон'югатів, гідропероксидів ліпідів, малонового діальдегіду, інтенсивність вільнорадикальних процесів та антирадикальну спроможність мікросом печінки білих щурів-самців лінії Вістар. Встановлено, що напрямок ступеню порушень й строки виникнення змін компонентів монооксигеназної системи, показників окремих стадій перекисного окиснення ліпідів визначаються як будовою, так й інтенсивністю та тривалістю дії ксенобіотиків.*

Ключові слова: мікросомальне окиснення, ксенобіотики, цитохроми, тканинне дихання, окисне фосфорилування.

*Робота виконана у рамках науково-дослідної роботи «Медико-екологічна характеристика факторів навколишнього й виробничого середовища та здоров'я Харківського регіону у зв'язку з проблемою формування методичних підходів впровадження моніторингу здоров'я», № держ. реєстрації 01940038038.*

### **Вступ**

У процесі еволюції в живих організмах сформувалися ферментні системи, які забезпечують їхнє виживання в умовах агресивного хімічного оточення. Ці системи представлені численними ферментами, які здійснюють окиснення, відновлення, гідроліз і кон'югацію чужорідних сполук. Біотрансформація ксенобіотиків тісно пов'язана з метаболізмом ендogenous речовин і для багатьох ферментів виявлені як ксенобіотичні, так і ендобіотичні субстрати [1]. У більшості випадків метаболічні перетворення чужорідних хімічних речовин в організмі приводить до прискорення їхньої елімінації й зниження біологічної активності. Однак, нерідко в процесі метаболізму ксенобіотиків утворюються реакційноспроможні інтермедіати й активні форми кисню, які ковалентно зв'язуються із клітинними макромолекулами, компонентами мембран і активують оксидативний стрес. Істотний внесок у забезпечення механізмів формування оксидативного стресу вносить структурно-функціональний стан моноокси-

геназної системи й дихального ланцюга електронного транспорту клітин різних органів, тканин і в першу чергу печінки, нирок, легенів, наднирників та ін. [2]. Індукція або блокування активності метаболізуючих ферментів ендоплазматичної сітки, мітохондрій, пероксисом, лізосом має істотний вплив на перетворення ксенобіотиків в організмі й розвиток патологічних станів. Для оцінки резервних можливостей, ступеня стійкості організму шкідливим факторам навколишнього й виробничого середовища, найбільш адекватними є методи вивчення модифікуючої дії хімічних забруднювачів на рівні мікросомальної оксигеназної системи з паралельним дослідженням можливих несприятливих ефектів на рівні мембраноструктурних ферментів [3]. Основною структурно-функціональною одиницею, що здійснює ці процеси, є ендоплазматична сітка гепатоцитів, а саме ферментна система мікросомальної мембрани, яка приймає участь у детоксикації неполярних чужорідних сполук. Особливий інтерес представляють дослідження й метаболі-

чних процесів у мітохондріях за впливу на організм шкідливих антропогенних факторів. Найважливішою ланкою, яка забезпечує функціонування відновних синтезів, являються біоенергетичні процеси й пов'язані з ними поглинання неорганічного фосфату й споживання кисню. Наявні в літературі дані про функціональний стан мітохондрій вказують на істотні порушення процесів дихання й фосфорилування в умовах інтоксикації організму [4,5]. Оцінка стану мікросомального окиснення, процесів дихання й фосфорилування є актуальним при вивченні механізму біологічної дії ксенобіотиків.

**Мета дослідження**

У зв'язку з вищевикладеним метою роботи було вивчення монооксигеназної системи мікросом і сполучення процесів тканинного дихання та фосфорилування в умовах хронічного експерименту при впливі ксенобіотиків.

**Об'єкт та методи дослідження**

Об'єктом дослідження були тварини популяції Вістар, яким перорально за допомогою металевого зонда вводилися водяні розчини ксенобіотиків в дозах 1/10; 1/100; 1/1000 DL<sub>50</sub>. Тривалість підгострого досліду на теплокровних тваринах становила 1,5 місяця. По закінченні експерименту проведено вивчення впливу похідних фенолу на дві мікросомальні електронно-транспортні системи печінки щурів: НАДФ·Н-пов'язану із цитохромом P<sub>450</sub> як кінцева ланка й НАД·Н-систему із цитохромом b<sub>5</sub> як акцептор електронів. Досліджували такі параметри мікросомального окиснення, як дихальна активність, вміст цитохромів P<sub>450</sub>, b<sub>5</sub>, активність редуказ. Найбільш повно й об'єктивно активність системи мікросомального окиснення може бути оцінена по швидкості метаболізму ксенобіотиків, що відображає активність як початкових (НАДФ·Н, НАД·Н-редуктаз), так і термінальних (цитохроми) ділянок. Як субстрат мікросомальної P<sub>450</sub>-залежної системи використали р-нітроанізол – ксенобіотик, який піддається окисному деметилюванню з утворенням р-нітрофенолу, який має характерний спектр поглинання в лужному середовищі. У роботі досліджували такі параметри мікросомального окиснення як активність о-деметилази, НАДФ·Н-цитохром-с-редуктази, НАД·Н-цитохром с-редуктази, швидкість ендogenous подиху мікросом, швидкість окиснення НАДФ·Н, швидкість окиснення НАД·Н у присутності ЕДТА, швидкість перекисного окиснення ліпідів і вміст цитохромів P<sub>450</sub> і b<sub>5</sub> [7]. Вимір активності Ca<sup>2+</sup> і Mg<sup>2+</sup>-залежної АТФази проводили загальноприйнятим

методом.

Утримання тварин та експерименти проводилися відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 2005), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених П'ятим національним конгресом з біоетики (Київ, 2013).

**Результати досліджень та їх обговорення**

Вивчення о-деметилазної активності мікросом печінки щурів показав, що під впливом похідних фенолу в дозі 1/10 і 1/100 DL<sub>50</sub> процеси детоксикації ксенобіотиків інтенсифікуються. У більшій мірі посилення деметилювання відзначалося в 1/10 DL<sub>50</sub>, істотно нижче ці процеси були в дозі 1/100 DL<sub>50</sub>, однак у всіх випадках вірогідно підвищувалися порівняно до контрольної групи. Ксенобіотики в умовах підгострого досліду підвищували НАДФ·Н й НАД·Н-цитохром-с-редуктазну активність, утворюючи вплив на два електронно-транспортні мікросомальні ланцюги: монооксигеназний та редуказний. Швидкість ендogenous подиху мікросом і окиснення НАДФ·Н, НАД·Н у присутності ЕДТА, а також інтенсивність перекисного окиснення ліпідів підвищувалися у випадку перорального надходження в організм 1/10 і 1/100 DL<sub>50</sub> ксенобіотиків. Речовини підвищували вміст цитохрому P<sub>450</sub> і не впливали на концентрацію цитохрому b<sub>5</sub>.

Результати оцінки впливу ксенобіотиків на монооксигеназний та редуказний ланцюг мікросом ендоплазматичної мережі гепатоцитів свідчать про те, що дані речовини, що є стресовим фактором на тваринний організм, збільшували всі досліджені параметри мікросомального окиснення, окрім вмісту цитохрому b<sub>5</sub>. Отримані дані виявили, що випробувані препарати стимулюють вільнорадикальні процеси, перекисне окиснення ліпідів, є індукторами продукції активних форм кисню, що підтверджується підвищенням рівня практично всіх параметрів окисної гідроксилуючої монооксигеназної системи (табл. 1).

Найважливішим фактором, який забезпечує функціонування відновних синтезів, є біоенергетичні процеси й пов'язані з ними поглинання неорганічного фосфату й споживання кисню, які супроводжуються генерацією макроергічних субстратів і в першу чергу АТФ [8]. У зв'язку з вищевикладеним актуальним було вивчення впливу ксенобіотиків у субтоксичній дозі на біоенергетичні процеси в умовах хронічного експерименту.

*Таблиця 1  
Вплив похідних фенолу на систему мікросомального окиснення в дозі 1/100 DL<sub>50</sub>.*

Показники	Дослід	Контроль
О-деметилаза (нмоль р-нітрофенолу/хв-мг білка)	9,62 ± 0,90*	6,69 ± 0,64
НАДФ·Н-цитохром-с-редуктаза (нмоль цитохрому с/хв-мг білка)	222,1 ± 30,3	202,0 ± 24,3
НАД·Н-цитохром-с-редуктаза (нмоль цитохр с/хв-мг білка)	1205,2±293,4	955,1± 182,3
Швидкість ендogenous подиху (нмоль O <sub>2</sub> /хв-мг білка)	2,84 ± 0,33*	1,40 ± 0,35

Швидкість окиснення НАДФ-Н у присутності ЕДТА (нмоль O <sub>2</sub> /хв·мг білка)	6,06 ± 0,42*	2,91 ± 0,52
Швидкість окиснення НАДФ-Н у присутності ЕДТА (нмоль O <sub>2</sub> /хв·мг білка)	8,90 ± 1,24*	3,31 ± 0,41
Швидкість перекисного окиснення ліпідів (нмоль O <sub>2</sub> /хв·мг білка)	2,91 ± 0,60*	0,42 ± 0,11
Вміст цитохрому P <sub>450</sub> (нмоль/мг білка)	0,917±0,211*	0,652±0,212
Вміст цитохрому b <sub>5</sub> (нмоль/мг білка)	0,647±0,131	0,620±0,104

Примітка: \* - розходження достовірні p < 0,05.

Таблиця 2

Вплив похідних фенолу в дозі 1/100 DL<sub>50</sub> на метаболічний стан мітохондрій гепатоцитів в умовах хронічного досліджу (M±m)

Показники	Дослід	Контроль
Подих після додавання сукцинату (нмоль O <sub>2</sub> ·хв <sup>-1</sup> ·мг <sup>-1</sup> білка)	1,38±0,024*	1,7 ± 1,04
Подих після додавання АДФ (нмоль O <sub>2</sub> ·хв <sup>-1</sup> ·мг <sup>-1</sup> білка)	4,10 ± 1,20*	6,15 ± 0,36
Подих після додавання роз'єднувача 2,4-ДНФ (нмоль O <sub>2</sub> ·хв <sup>-1</sup> ·мг <sup>-1</sup> білка)	5,00 ± 0,16*	7,3 ± 0,44
Дихальний коефіцієнт ДК = АТФ/сукцинат (відн. од.)	2,97 ± 0,16*	3,8 ± 0,18
Коефіцієнт фосфорилування – АДФ/O <sub>2</sub>	1,70 ± 0,04*	2,7 ± 0,3
Mg <sup>2+</sup> -активована АТФаза (мкмоль Р/мг білка·1годину)	64,03 ± 1,7*	81,52 ± 2,4
Ca <sup>2+</sup> -активована АТФаза (мкмоль Р/мг білка·1годину)	59,65±1,73*	66,3 ± 2,1

Примітка: \* - розходження достовірні p < 0,05.

Результати досліджень показали, що швидкість окиснення сукцинату сукцинатдегідрогеназою у метаболічному стані мітохондрій досліджуваних груп тварин трохи знижувалася в порівнянні з контрольною групою (табл. 2).

З огляду на тісний зв'язок ферменту сукцинатдегідрогенази із внутрішньою мембраною мітохондрій, можна припускати порушення її структурно-функціонального стану, пов'язаного зі зміною фізико-хімічних властивостей: мембранної проникності, в'язкості, заряду, гідрофобного об'єму, полярності та ін. Зміна фізико-хімічних властивостей мембран сполучена з порушенням біоенергетичних і синтетичних процесів [8]. Експериментальне вивчення метаболічного стану мітохондрій гепатоцитів щурів контрольної групи виявило досить його високий рівень за всіма досліджуваними показниками і енергетичними станами. Так, додавання акцептора та додатково роз'єднувача 2,4-ДНФ викликало збільшення швидкості подиху в присутності сукцинату й АТФ, пов'язаного зі зниженням мембранного потенціалу [9]. При цьому спостерігали зниження швидкості подиху в присутності 2,4-ДНФ, що супроводжувалося зниженням дихального коефіцієнта до 2,97 ± 0,16 відн.од. Дослідження виявили, що ксенобіотики в умовах хронічного досліджу на білих щурах приводили до зниження окисного фосфорилування в мітохондріях гепатоцитів і збільшували частку вільного дихання. Про це свідчило зниження інтенсивності дихання в безакцепторному середовищі й у метаболічному стані після додавання АДФ. Дихальний коефіцієнт (відношення АТФ/сукцинату) і коефіцієнт фосфорилування (АДФ/O<sub>2</sub>) істотно знижувався в досліджуваних групах тварин, що дозволило судити про роз'єднання дихання й фосфорилування [10]. Регенерація АДФ при оцінці АТФ-гідролазної реакції знижувалася також у досліджуваних групах порівняно з контролем. Виражене пригнічення дихання указує на зниження інтенсивності реакції окисного фосфорилування й синтезу АТФ, яке може бути пов'язане зі зміною структури мітохондрій і їхньою фрагментацією. Дослідження свідчили, що ксенобіотики в

дозах 1/10; 1/100 DL<sub>50</sub> приводять до порушення окисного фосфорилування й тканинного дихання, що супроводжується зниженням продукції макроергічних субстратів і в першу чергу АТФ. Наведені результати про порушення метаболічного стану мітохондрій гепатоцитів корелювали з активністю їхніх АТФаз (табл. 2). Оскільки активність АТФаз мітохондрій пов'язують із процесами окиснення й фосфорилування, ці дані становлять значний інтерес для розуміння структурно-метаболічних механізмів формування патогенезу інтоксикації організму експериментальних тварин, що піддавалися впливу похідних фенолів.

### Висновки

Таким чином, результати досліджень свідчать про те, що похідні фенолів в дозах 1/10 і 1/100 DL<sub>50</sub> інгібуюче впливають на процеси біоенергетики, приводять до роз'єднання тканинного дихання й окисного фосфорилування, стимулюють вільнорадикальні процеси й перекисне окиснення ліпідів, формуючи при цьому патологічні реакції, в основі яких лежить вільнорадикальна патологія, енергетичний голод і тканинна гіпоксія клітин.

### Перспективи подальших досліджень

В подальшому планується вивчення активності нейромедіаторів і «вторинних месенджерів» при дії на організм теплокровних тварин малих доз досліджуваних речовин з метою обґрунтування особливостей механізму їхньої біологічної дії, виявлення змін енергетичного забезпечення пристосувальних реакцій.

### Література

1. Григорьев А. И. Молекулярные механизмы адаптации к стрессу: гены раннего ответа / А. И. Григорьев, А. Г. Тоневский // Физиол. ж-л. - 2009. - Т. 95, № 10. - С. 1041-1057.
2. Зайцева О.В. Структурно-функциональное состояние цитоплазматических мембран при субхроническом токсическом воздействии на организм теплокровных животных оксидирированного ксилита Л-655-2-100 / О.В. Зайцева, В.А. Телегин, В.И. Жуков [та ін.] // Экспериментальная и клиническая медицина. - 2007. - № 3. - С. 63-67.
3. Андреев А.Ю. Метаболизм активных форм кислорода в митохондриях / А.Ю. Андреев, Ю.Е. Кушнарера, А.А. Старков // Биохимия. - 2005. - Т. 70, Вып. 2. - С. 246-264.

4. Попова Л.Д. Олигоэфирные – модуляторы радиомиметических эффектов / Л.Д. Попова, В.И. Жуков, В.В. Мясоедов [и др.] // Медицина сегодня и завтра. – ХГМУ. – 2004. - № 4. – С. 51-59.
5. Биологическая активность детергентов – производных нонилбензолов в связи с проблемой охраны водных объектов / [В.И. Жуков, С.А. Стеценко, В.И. Пивень и др.]. – Белгород : ОАО «Белвитамины», 2000. – 237 с.
6. Методические основы регламентации сложных смесей: триэтаноламиновых солей алкилфосфатов и алкилполифосфатов в воде водоёмов / [А.Я. Цыганенко, Н.Г. Щербань, Л.А. Бондаренко и др.]. – Белгород, 2001. – 178 с.
7. Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования в клинике / В.В. Меньшиков. – М. : Медицина, 1987. – 368 с.
8. Боев В.М. Свободнорадикальное окисление в оценке риска здоровья / В.М. Боев, С.И. Красиков, Н.В. Свистунова [и др.] // Гигиена и санитария. – 2006. - № 5. – С. 19-20.
9. Октябрьский О.Н. Редокс-регуляция клеточных функций / О.Н. Октябрьский // Биохимия. - 2007. - Т. 72, Вып. 2. - С. 158-174.
10. Луцак В.И. Свободнорадикальное окисление белков и его связь с функциональным состоянием организма / В.И. Луцак // Биохимия. - 2007. – Т. 72, Вып. 8. - С. 995-1017.

### Реферат

ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ФЕНОЛА НА СОПРЯЖЕНИЕ ПРОЦЕССОВ МИКРОСОМАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ И БИОЭНЕРГЕТИКИ В ХРОНИЧЕСКОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Наконечная С.А., Гафт К.Л., Коший Е.Е., Наконечный Е.В.

Ключевые слова: микросомальное окисление, ксенобиотики, цитохромы, тканевое дыхание, окислительное фосфорилирование.

В статье была описана взаимосвязь между активностью монооксигеназной системы и состоянием процессов липопероксидации в микросомах печени крыс при действии на организм производных фенола. Используя методы дифференцированного ультрацентрифугирования, спектрофотометрии и хемилюминесцентного анализа, определена активность НАДФ-цитохром-с-редуктазы, содержание цитохромов  $b_5$  и P-450, диеновых конъюгатов, гидроперекисей липидов, малонового диальдегида, интенсивность свободнорадикальных процессов и антирадикальную способность микросом печени белых крыс-самцов линии Вистар. Установлено, что направление, степени нарушений и сроки возникновения изменений компонентов монооксигеназной системы, показателей отдельных стадий перекисного окисления липидов определяются как строением, так и интенсивностью и длительностью действия ксенобиотиков.

### Summary

INFLUENCE OF PHENOL DERIVATIVES ON CONNECTION BETWEEN PROCESSES OF MICROSOMAL OXIDATION AND BIOENERGY IN CHRONIC EXPERIMENT ON TEST ANIMALS

Nakonechna S. A., Gaft K. L., Koshchii Ye.Ye., Nakonechniy Ye. V.

Key words: microsomal oxidation, oxidative stress, biotransformation of xenobiotics, alkylphenols, isononilphenols.

This article describes the interconnection between the activity of monooxygenase system and the state of lipid peroxydation in liver microsomes of rats exposed to oxyethylated alkyl phenols and isononilphenols. We used differential ultracentrifugation, spectrophotometry and chemo luminescence analysis, as well as we assessed the activity of NADF cytochrome reductases, the content of  $B_5$  and P-450 cytochromes, diene conjugates, lipid hydroperoxides, malonic dialdehyde, the intensity of free radical processes and antiradical capability of liver microsomes of white Wistar male rats. The findings obtained have demonstrated that direction and intensity of damages as well as the terms when component changes of monooxygenation system arise, the indices of separate stages of lipid peroxydation are determined by the structure, intensity and duration of xenobiotic action.