

УДК 61: 613.-613.2. – 613.62

**ВПЛИВ ОЛІГОЕФІРІВ МАРОК Л-3603-2-12 ТА Л-10002-2-80 НА
МІКРОСОМАЛЬНЕ ОКИСЛЕННЯ ГЕПАТОЦИТІВ І ТКАНИННЕ
ДИХАННЯ МІТОХОНДРІЙ В ОРГАНІЗМІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ
ТВАРИН В УМОВАХ ТРИВАЛОЇ СУБТОКСИЧНОЇ ДІЇ**

Безродна А.І., Жуков В.І., Щербань Н.Г., Ващук Н.А.

Харківський національний медичний університет

Вивчення наслідків тривалого субтоксичного впливу 2-х нових марок олігоефірів на стан монооксигеназної системи мікросом гепатоцитів, тканинне дихання і окислювальне фосфорилування в мітохондріях показало, що олігоефіри марок Л-3603-2-12 і Л-10002-2-80 в дозі 1/100 ДЛ₅₀ стимулюють мікросомальну монооксигеназну систему гепатоцитів, перекисне окислення ліпідів, що пов'язано з пригніченням тканинного дихання і окислювального фосфорилування в основі яких лежить розвиток молекулярної мембранної патології.

***Ключові слова:** олігоефіри, мікросомальне окислення, токсичність, ксенобіотики, система детоксикації.*

Вступ. Олігоефіри відносяться до класу простих поліефірів, які знайшли широке використання в різних галузях народного господарства як кінцеві продукти для одержання гідравлічних гальмівних і охолоджуючих рідин, антикоррозійних препаратів, емульгаторів, так і проміжних, що використовуються для виробництва пластмас, пінопластів, епоксидних смол, лаків, емалей, штучної шкіри та ін. [1-3]. За масштабами світового виробництва олігоефіри займають друге місце після поверхнево-активних речовин. Щорічно з'являються нові марки олігоефірів з регламентованими фізико-хімічними властивостями, які потребують складання прогнозів потенційної небезпеки для довкілля і здоров'я населення.

Відомо, що більшість ксенобіотиків, які надходять різними шляхами до організму, здатні підлягати багаточисельним перетворенням, внаслідок чого підвищується їх розчинність і знижується токсичність. Проте бувають випадки коли токсичність ксенобіотиків зростає в процесі їх метаболізму, або спостерігається модифікація біологічного ефекту. Дуже часто в процесі метаболізму і біотрансформації хімічних сполук утворюються реакційноздатні інтермедіати і активні форми кисню (АФК), які ковалентно зв'язуються з клітинними макромолекулами, компонентами мембран і активують оксидативний стрес. Значний внесок в формування механізмів його виникнення вносить монооксигеназна система мікросом і дихальні електронно-транспортні ланцюги мітохондрій клітин різних органів і тканин, і впершу чергу, печінки, нирок, легень, наднирників та ін. [4-5]. Провідною системою в біотрансформації неполярних хімічних сполук і ендogenous токсинів є монооксигеназна система (МОС) мікросом гепатоцитів, яка представлена цитохромами P₄₅₀ і V₅, НАДФН – і НАДН-оксидоредуктазами. Особливістю функціонування МОС є її здатність до індукції під впливом багатьох хімічних сполук екзо- і ендogenous походження, яка носить пристосувальний характер. Проте, існують і шкідливі наслідки індукції: активація канцерогенеза, мутагенеза, швидкості старіння організму, порушення обміну вітамінів, гормонів, білків, жирів, вуглеводів, нуклеїнових кислот та ін. Відомо, що індукція або блокування активності метаболізуючих ферментів ендoplasmатичної мережі, мітохондрій, пероксисом, лізосом може суттєво впливати на перетворення ксенобіотиків в організмі і створювати умови для формування екологічно обумовлених патологічних станів [3]. Для оцінки резервних можливостей ступеня стійкості організму до шкідливих факторів навколишнього і виробничого середовища, найбільш адекватним є методи вивчення модифікаційної дії хімічних забруднювачів на рівні мікросомальної МОС з паралельним дослідженням можливих несприятливих ефектів при оцінці активності мембрано-структурованих

ферментів, що приймають участь в детоксикації ксенобіотиків [4]. При цьому, особливого значення набувають дослідження метаболічних процесів і в мітохондріях, які є потужними генераторами активних форм кисню та АТФ для відновлювальних синтезів [6].

У даному випадку різнонаправлена реакція системи у формі як активації дихального ланцюга, так і його пригнічення, може бути наслідком впливу на організм теплокровних утвореного комплексу у складі самих ксенобіотиків та продуктів їх біотрансформації – метаболітів.

Як правило, ступінь дисфункції тканинного дихання і окислювального фосфорилування при токсифікації ксенобіотиками тісно поєднані з розвитком і стадією патологічного процесу. Аналіз показує, що діагностика стану мікосомального окислення, тканинного дихання і окислювального фосфорилування, як основних генераторів активних форм кисню є актуальною медико-біологічною проблемою.

У зв'язку з вищенаведеним, метою роботи є вивчення наслідків тривалого субтоксичного впливу 2-х нових марок олігоєфірів на стан монооксигеназної системи мікосом гепатоцитів, тканинне дихання і окислювальне фосфорилування в мітохондріях.

Матеріали і методи. Вибір олігоєфірів, як об'єктів дослідження було обгрунтовано їх широким застосуванням в різних галузях народного господарства, необхідністю гігієнічної регламентації та розробки профілактичних заходів для охорони водойм та здоров'я населення.

Програма роботи передбачала проведення підгострого токсикологічного експерименту на білих щурах популяції Вістар (масою 190-200 г). В процесі експерименту тварини підлягали пероральній затравці олігоєфірами марок Л-3603-2-12 (поліоксипропіленоксиетилентриол молекулярною масою 3600) і Л-10002-2-80 (поліоксиетиленоксипропілендіол молекулярною масою 10000). Ксенобіотики вводилися щоденно вранці натщесерце за допомогою металевого зонду в дозах 1/100 і 1/1000 ДЛ₅₀

тільки для більш токсичного олігофіру. Тривалість токсифікації тварин становила 45 діб.

При розрахунках доз було враховано результати дослідження гострої токсичності, які дозволили встановити середньосмертельні дози (DL_{50}) на рівнях: 3,34 і 38,4 г/кг маси тварин, що дає підставу судити про помірно- і слаботоксичні властивості, відповідно у Л-3603-2-12 і Л-10002-2-80 [1,2]. Експерименти на щурах проводилися з дотриманням міжнародних принципів європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для досліджень та інших наукових цілей. – Страсбург, 1985.

Задачі дослідження включали вивчення впливу олігофірів на мітосомальну електронно-транспортну систему: НАДФН-зв'язану з цитохромом P_{450} в якості кінцевого ланцюга і НАДН-систему, зв'язану з цитохромом v_5 в якості акцептора електронів. Підлягали вивченню наступні параметри мітосомального окислення: дихальна активність, вміст цитохромів P_{450} і v_5 , активність редуктаз. Відомо, що найбільш повно і об'єктивно активність системи мітосомального окислення може бути оцінена за швидкістю метаболізму ксенобіотиків, що віддзеркалює активність як початкових (НАДФН, і НАДН-редуктаз), так і термінальних (цитохроми P_{450} і v_5) ділянок. В якості субстрата мітосомальної P_{450} – залежної системи використовували р-нітроанізол – ксенобіотик, який піддається окислювальному деметилуванню з утворенням р-нітрофенола з властивим спектром поглинання в лужному середовищі. Крім того, в роботі оцінювались такі параметри мітосомального окислення як активність о-деметилази, НАДФН-цитохром – С-редуктази, НАДН-цитохром – С-редуктази, швидкість ендogenous дихання мітосом, швидкість окислення НАДФН, швидкість окислення НАДФН в присутності ЕДТА, швидкість перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) і вміст цитохромів P_{450} і v_5 [1,2,3]. Дослідження метаболічного стану мітохондрій проводили полярографічним методом [7,8] на основі визначення швидкості споживання кисню в

безакцепторному середовищі [4] в присутності акцептора (№3), швидкості споживання кисню в присутності роз'єднувача – 2,4-динітрофенола (2,4-ДНФ) після витрати доданого АДФ (№4), а також розраховали: 1) відношення АДФ/O₂, яке подібне по своєму значенню з коефіцієнтом P/O і характеризує поєднаність процесів окислення і фосфорилування в дихальному ланцюзі; 2) дихальний коефіцієнт (ДК) Ларді - відношення швидкості поглинання кисню в метаболічному стані №3 до швидкості поглинання кисню в метаболічному стані №4 (до внесення у лунку АДФ); 3) активність АТФ-гідролазних реакцій як відношення №3/№4, яке характеризує швидкість регенерації АДФ після його фосфорилування. В якості субстрата окислення використовували сукцинат [7,8]. Визначення Ca²⁺, Mg²⁺ - залежності АТФази в гепатоцитах здійснювали загальноприйнятим методом [7]. Отримані дані опрацьовували методами варіаційної статистики з використанням критерія Стьюдента-Фішера.

Результати дослідження і їх обговорення. Результати дослідження свідчать, що олігоефіри підвищують у дозі 1/100 ДЛ₅₀ активність о-деметилази, НАДФН-цитохром–С-редуктази, НАДН-цитохром – С-редуктази, швидкість ендogenous дихання, швидкість окислення НАДФН, швидкість окислення НАДФН в присутності ЕДТА, швидкість перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) і вміст цитохромів P₄₅₀ і v₅ в мікросомах гепатоцитів. Так, о-деметилазна активність під впливом 1/100 ДЛ₅₀ зростала на 148,51% і 99,40% , НАДФН-цитохром–С-редуктазна на 66,64% і 49,32%, НАДН-цитохром–С-редуктазна на 68,75% і 60,34%, швидкість ендogenous дихання на 122,78% і 100,63%, швидкість окислення НАДФН на 129,84% і 116,82%, швидкість окислення ПОЛ на 348,07% і 307,69%, вміст цитохрому P₄₅₀ на 133,68% і 93,35%, вміст цитохрому v₅₀ зростало на 121,84% і 108,40%, відповідно у груп тварин токсифікованих Л-3603-2-12 і Л-10002-2-80.

Одержані результати дають змогу зробити висновок, що ксенобіотики найбільш суттєво впливали на активність метаболізуючих ферментів і

перекисне окислення ліпідів, які можуть бути поєднані з утворенням реакційно спроможних кисневих радикалів здатних пошкоджувати крупні макромолекули – білки, глікопротеїни, нуклеїнові кислоти – РНК, ДНК та ін. При цьому, визначено, що олігоефіри в дозі 1/100 ДЛ₅₀ стимулюють всі параметри мітросомальної монооксигеназної системи, а в дозі 1/1000 ДЛ₅₀ не впливають на функцію детоксикації печінки.

Таблиця 1

Вплив олігоефірів на систему мітросомального окислення організму білих щурів в підгострому експерименті

Показники	Контроль	Ксенобіотики, М/м (ДЛ ₅₀),		
		Л-3603-2-12		Л-10002-2-80
		1/100	1/1000	1/100
О-деметилаза (нмоль р-нітрофенола /хв · мг білка)	6,72±0,47	16,7±1,35*	6,53±0,62	13,4±1,22*
НАДФН-цитохром С-редуктаза, (нмоль цитохрома С/хв · мг білка)	178,4±15,3	297,3±15,6*	182,6±17,4	266,4±12,8*
НАДН-цитохром С-редуктаза, (нмоль цитохрома С/хв · мг білка)	843,6±32,5	1423,6±48,7*	867,5±29,8	1352,7±35,4
Швидкість ендogenousного дихання (нмоль O ₂ /хв · мг білка)	1,58±0,17	3,52±0,28*	1,63±0,22	3,17±0,32*
Швидкість окислення НАДФН, (нмоль O ₂ /хв · мг білка)	3,15±0,28	7,24±0,56*	3,46±0,35	6,83±0,64*
Швидкість окислення НАДФН в присутності ЕДТА, (нмоль O ₂ /хв · мг білка)	2,78±0,31	6,75±0,42*	2,96±0,27	6,24±0,53*
Швидкість перекисного окислення ліпідів, (нмоль	0,52±0,03	2,33±0,19*	0,55±0,06	2,12±0,22*

О ₂ /хв · мг білка)				
Вміст цитохрома Р ₄₅₀ , (нмоль /хв · мг білка)	0,843±0,06	1,97±0,12*	0,849±0,07	1,63±0,09*
Вміст цитохрома в ₅ , (нмоль /хв · мг білка)	0,595±0,05	1,32±0,08*	0,603±0,08	1,24±0,10*

Примітка: * - різниця вірогідності $p < 0,05$.

Відомо, що важливими факторами, які забезпечують функціонування відновлювальних синтезів, є біоенергетичні процеси і поєднані з ними тканинне дихання і окислювальне фосфорилування, які супроводжуються генерацією макроергічних субстратів і, в першу чергу, АТФ [3,7]. В зв'язку з цим, актуальним було вивчення впливу Л-3603-2-12 і Л-10002-2-80 в субтоксичній дозі (1/100 ДЛ₅₀) на метаболічний стан мітохондрій в умовах тривалого субтоксичного експерименту. Результати досліджень показали, що швидкість окислення субстрата – сукцината ферментом сукцинатдегідрогеназою в метаболічному стані мітохондрій №4 дослідних тварин пригнічується у порівнянні з контрольною групою (табл. 2). Враховуючи тісний зв'язок фермента з внутрішньою мембраною мітохондрій [8] можна передбачити, що олігоєфіри порушують її структурно-функціональний стан і фізико-хімічні властивості: мембранну проникність, в'язкість, заряд, гідрофобний об'єм, полярність, щільність внаслідок активації вільнорадикальних процесів і ПОЛ.

Таблиця 2

Вплив 1/100 ДЛ₅₀ олігоєфірів в підгострому експерименті на метаболічний стан мітохондрій гепатоцитів

Показники	Контроль	Група тварин, М/т	
		Л-3603-2-12	Л-10002-2-80
		Дихання мітохондрій після внесення сукцинату (№4), (нмоль О ₂ /хв · мг	1,84±0,16

білка)			
Дихання мітохондрій після внесення АДФ (№3), (нмоль O ₂ /хв · мг білка)	6,27±0,38	3,15±0,24*	3,20±0,27*
Дихання мітохондрій після внесення 2,4-ДНФ (№4), (нмоль O ₂ /хв · мг білка)	7,34±0,65	3,87±0,26*	3,92±0,33*
ДК Ларді=№3/№4 (відн. од.)	3,40±0,24	2,21±0,18*	2,09±0,15*
Коефіцієнт фосфорилування - АДФ/O ₂	2,80±0,26	1,52±0,14*	1,65±0,18*
Mg ²⁺ -АТФаза (мкмоль р/мг білка · годину)	82,62±3,75	58,3±4,10*	62,7±3,52*
Ca ²⁺ -АТФаза (мкмоль р/мг білка · годину)	69,5±3,14	48,8±3,22*	55,8±2,78*
H ⁺ -АТФаза (мкмоль р/мг білка · годину)	77,66±3,20	45,14±3,16*	52,36±0,42*

Примітка: * - різниця вірогідності p<0,05.

Дослідження показали, що ксенобіотики в дозі 1/100 ДЛ₅₀ знижували дихання мітохондрій після додавання АДФ (№3) і внесення 2,4-ДНФ (№4), дихальний коефіцієнт Ларді і коефіцієнт фосфорилування у порівнянні з групою інтактних - контрольних тварин. Дослідження свідчать, що олігоефіри в субтоксичній дозі 1/100 ДЛ₅₀ пригнічують окислювальне фосфорилування і тканинне дихання мітохондрій. Аналіз показників дихального коефіцієнта (№3/№4) і коефіцієнта фосфорилування у експериментальних тварин значно знижувалися, що дозволило судити про роз'єднання процесів дихання і окислювального фосфорилування [7,8]. Регенерація АДФ при оцінці АТФ-гідролазної реакції була також знижена

під впливом ксенобіотиків. Значне пригнічення дихання в метаболічному стані №3 переконливо свідчить про зниження інтенсивності реакцій окислювального фосфорилування і синтезу АТФ, що може бути поєднано з розвитком мембранної патології і фрагментації структури мітохондрій. Ці дані підтверджувалися зниженням активності ферментів Ca^{2+} і Mg^{2+} -залежних АТФаз і H^{+} -АТФази, які вказують на роз'єднання дихання і фосфорилування та пригнічення синтезу АТФ [7,8].

Таким чином, результати досліджень свідчать, що олігоефіри марок Л-3603-2-12 і Л-10002-2-80 в дозі $1/100$ ДЛ₅₀ стимулюють мікросомальну монооксигеназну систему гепатоцитів, перекисне окислення ліпідів, що пов'язано з пригніченням тканинного дихання і окислювального фосфорилування в основі яких лежить розвиток молекулярної мембранної патології. В дозі $1/1000$ ДЛ₅₀ ксенобіотики не впливають на функцію детоксикації печінки і метаболічну активність мітохондрій та біоенергетичні процеси.

Одержані результати дають основу для висновку про те, що об'єкти дослідження здатні впливати на генетичний апарат, оскільки за хімічною природою вони є метаболізерами і активаторами перекисного окислення ліпідів.

Література

1. Попова Л.Д. Олигоефиры – модуляторы радиомиметических эффектов / Л.Д. Попова, В.И. Жуков, В.В. Мясоедов и др. // Медицина сегодня и завтра. – 2004. - №4. – С. 51-59.
2. Жуков В.И. Простые и макроциклические эфиры: научные основы охраны водных объектов / В.И. Жуков, Л.Д. Попова, О.В. Зайцева и др. – Харьков: «Торнадо», 2000. – 438 с.
3. Щербань Н.Г. Биохимические механизмы радиомиметических эффектов поверхностно-активных веществ / Н.Г. Щербань, В.И. Жуков, В.В. Мясоедов и др. – Харьков: «Раритеты Украины», 2012. – 120 с.

4. Сидоренко Г.И. Методические и теоретические аспекты гигиены окружающей среды / Г.И. Сидоренко // Гигиена окружающей среды в СССР. – М: Медицина, 1989. – С. 5-14.

5. Цыганенко А.Я. Методические основы регламентации сложных смесей: триэтаноламиновых солей алкилфосфатов и алкилполифосфатов в воде водоемов / А.Я. Цыганенко, Н.Г. Щербань, Л.А. Бондаренко и др. – Белгород, 2001. – 178 с.

6. Мясоедов В.В. Детергенты – модуляторы радиомиметических эффектов / В.В. Мясоедов, Ю.И. Козин и др. – Белгород, 2000. – 375 с.

7. Денисов В.М. Биохимия миокарда, поврежденного адреналином / В.М. Денисов, С.М. Рукавишникова, В.И. Жуков. – Харьков: РПИ «Оригинал». – 1999. – 183 с.

8. Сукачев С.В. Нарушение метаболизма при развитии нейрогенных поражений сердца и влияние на них некоторых фармакологических средств / С.В. Сукачев, Н.А. Новикова, В.А. Исаенко и др. // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 1974. - №2. – С. 50-51.

Аннотация

Безродная А.И., Жуков В.И., Щербань Н.Г., Ващук Н.А Влияние олигоэфиров марок л-3603-2-12 и л-10002-2-80 на микросомальное окисление гепатоцитов и тканевое дыхание митохондрий в организме экспериментальных животных в условиях длительного субтоксического действия
Изучение последствий длительного субтоксического влияния 2-х новых марок олигоэфиров на состояние монооксигеназной системы микросом гепатоцитов, тканевое дыхание и окислительное фосфорилирование в митохондриях показало, что олигоэфиры марок Л-3603-2-12 и Л-10002-2-80 в дозе 1/100 ДЛ50 стимулируют микросомальную монооксигеназную систему гепатоцитов, перекисное окисление липидов, что связано с угнетением тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования, в основе которых лежит развитие молекулярной мембранной патологии.
Ключевые слова: олигоэфиры, микросомальное окисление, токсичность, ксенобиотики, система детоксикации.

Summary

*A.I. Bezrodnaya, V.I. Zhukov, N.G. Shcherban, , N.A. Vashchuk **influence oligoesters marks l-3603-2-12 and l-10002-2-80 on microsomal oxidation hepatocytes and tissue respiration mitochondria in the experimental animals** Studying the effects of prolonged exposure of 2 new brands Oligoesters the state of monooxygenase system microsomes of hepatocytes, tissue respiration and oxidative phosphorylation in the mitochondria showed that Oligoesters makes L-3603-2-12 and L-10002-2-80 in dose 1/100 DL50 stimulate hepatocyte microsomal monooxygenase system, lipid peroxidation, which is associated with inhibition of tissue respiration and oxidative phosphorylation are based on the development of molecular membrane pathology.*

Key words: *Oligoesters, microsomal oxidation, toxicity, xenobiotics detoxification system.*