

УДК 577.125. 53:577.15:543. 395:616. 831

*О.А. Наконечна, С.О. Стеценко, Д.І. Маракушин, І.А. Вишницька\**

*Харківський національний медичний університет*

*\*Луганський державний медичний університет*

## **ВПЛИВ ПРОСТИХ ПОЛІЕФІРІВ НА ФОСФОЛІПІДНИЙ СКЛАД І АКТИВНІСТЬ ФЕРМЕНТНИХ МЕМБРАНОВ'ЯЗАНИХ КОМПЛЕКСІВ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЩУРІВ**

Вивчено вплив простих поліефірів на основі пропіленгліколей, гліцеролу та пентолу на фосфоліпідний склад і активність ферментних мембранозв'язаних комплексів гіпокампа щурів. Ксенобіотики на 30-ту добу за умов перорального введення у дозі 1/100 ДЛ<sub>50</sub> призводять до змін вмісту фосфоліпідних фракцій, зниження активності Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФази синапсом і сукцинатдегідрогенази мітохондрій, що свідчить про мембранотропну дію речовин.

**Ключові слова:** *проті поліефіри, фосфоліпіди, мембранозв'язуючі комплекси, сукцинатдегідрогеназа.*

Дослідження механізмів дії екзогенних хімічних сполук на організм людини – одна з пріоритетних задач сучасної ксенобіохімії [1]. Особливу актуальність при цьому набуває з'ясування структурно-функціонального стану клітинних мембран. Біологічна активність більшості хімічних сполук значною мірою опосередковується через мембранні механізми, впливаючи на фосфоліпідний склад і активність мембранозв'язаних ферментів. До хімічних сполук, з якими тісно контактує людина, відносяться прості поліефіри на основі пропіленгліколей, гліцеролу та пентолу. Останні характеризуються великими об'ємами виробництва, широким використанням у промисловості та побуті, надходженням до водних екосистем, у тому числі й до джерел питного водопостачання [2]. На даний час недостатньо вивченим є вплив простих поліефірів на основі пропіленгліколей, гліцеролу та пентолу на стан нервової системи, на рівні якої, як відомо, здійснюється реалізація багатьох ефектів. Особливості фізико-хімічних властивостей простих поліефірів, зокрема наявність гідрофільних і гідрофобних груп, здатність до хімічних перетворень з утворенням біоло-

гічно активних сполук [3] дозволяють припустити можливість проникнення цих речовин і продуктів їх деструкції крізь гематоенцефалічний бар'єр.

Метою даної роботи було вивчення вмісту фосфоліпідів, активності Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФази і сукцинатдегідрогенази у синапсомальній і мітохондріальній фракціях гіпокампа щурів за умов тривалої дії простих поліефірів у дозі 1/100 ДЛ<sub>50</sub>.

**Матеріал і методи.** Вивчення впливу простих поліефірів на основі пропіленгліколей, гліцеролу та пентолу на організм проводили з використанням тривалих (30 діб) експериментів на 40 статевозрілих щурах-самцях лінії WAG масою 180–220 г. Досліджували дію простих поліефірів на основі пропіленгліколей з молекулярною масою 2106 (ПГ-2106), на основі гліцеролу та пропіленгліколей з молекулярною масою 1136 (ГлПГ-1136), простих поліефірів на основі пентолу і пропіленгліколей з молекулярною масою 700 (ПнПГ-700). Тварин утримували у стаціонарних умовах віварію при постійній температурі та природному освітленні, маніпуляції над ними проводили відповідно до типових положень з питань біоетики. Щурів

піддавали пероральній затравці за допомогою металевого зонда водними розчинами щоденно одноразово протягом 30 діб у дозі 1/100 ДЛ<sub>50</sub>, що відповідно складало 0,0145 г/кг маси тварин для ПГ-2106; 0,015 г/кг для ГлПГ-1136 та 0,15 г/кг для ПнПГ-700. Тваринам контрольної групи вводили відповідні об'єми питної води. В дослідних і контрольній групах було по 10 тварин. По закінченні експерименту тварин декапітували гільйотинним ножом, попередньо анестезуючи тіопенталом натрію у дозі 50 мг/кг маси. Для отримання гомогенату головного мозку наважку тканини подрібнювали на холоді й гомогенізували протягом 1–2 хв в охолодженому середовищі виділення, що складалося з 0,32 М сахарози на 0,05 М трис-НСІ буфері, рН 7,4. Співвідношення тканина/середовище (маса/об'єм) складало 1 г/9 мл. Ядра і незруйновані клітини віддаляли шляхом центрифугування при 600 g протягом 10 хв. Надосадову рідину використовували для отримання мітохондріальної й синаптосомальної фракцій. На першому етапі супернатант центрифугували при 9000 g протягом 20 хв, осад суспендували у 2,5 мл 0,32 М сахарози. Суспензію нашаровували на 10 мл 0,8 М сахарози і центрифугували при 9 000 g протягом 25 хв. Осад, який містить важкі синаптосоми та мітохондрії, суспендували в 2,5 мл 0,32 М сахарози, нашаровували на 10 мл 1,1 М сахарози і центрифугували протягом 20 хв при 20 000 g. Синаптосоми осаджували центрифугуванням при 20 000 g протягом 30 хв. Для контролю чистоти отриманих фракцій проводили мікроскопічний аналіз осадів синаптосом і міжфракційної межі. Для вивчення фосфоліпідного складу синаптосом гіпокампа головного мозку екстракцію ліпідів проводили за методом М. Кейтса [4]. Екстракцію проводили сумішшю хлороформ-метанол-NH<sub>4</sub>ОН (7 н) у співвідношенні 120 : 70 : 9, випаровування екстрактів – у струмі сухого азоту. Для розділення індивідуальних фосфоліпідів на фракції використовували метод двомірної мікротонкошарової хроматографії [5]. Ідентифікацію фосфоліпідів проводили за стандартними розчинами і за допомогою специфічних реакцій. Кількісний вміст загальних і індивідуальних фосфоліпідів у ліпідних екстрактах оцінювали за кількістю

неорганічного фосфору, який визначали за допомогою молібденового реагенту [6]. Дослідження Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФазної активності в синаптосомах головного мозку щурів проводили спектрофотометричним методом шляхом визначення кінцевого продукту АТФазних реакцій після утворення забарвленого комплексу з молібдатом амонію [7]. Дослідження активності сукцинатдегідрогенази мітохондріальної фракції головного мозку проводили колориметрично за допомогою 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразольного броміду й синього формазану [8]. Цифровий матеріал статистично обробляли з використанням t-критерію Стьюдента. За критичний рівень значущості при перевірці статистичних гіпотез приймали p<0,05.

**Результати та їх обговорення.** Особливу чутливість до дії зовнішніх або внутрішніх факторів, як відомо, виявляє гіпокамп. Крім того, цій відділ головного мозку є відповідальним за важливі процеси, а саме формування емоційного стану [9]. На 30-ту добу ПГ-2106 і ГлПГ-1136 у дозі 1/100 ДЛ<sub>50</sub> порівняно з контролем достовірно значуще збільшували вміст фосфатидилхоліну (відповідно на 8 і 10 %), сфінгомієліну (на 27 і 18 %) і знижували вміст фосфатидилінозитулу (на 25 і 34 %), фосфатидилсерину (на 23 і 32 %). ПнПГ-700 при цьому виявляв менш виразний ефект, а саме він достовірно впливав на зміну вмісту лише фосфатидилінозитулу (на 20 %), зміни інших фосфоліпідних фракцій синаптосом гіпокампа були недовірними й практично дорівнювали значенням в контролі (табл. 1).

Виявлені зміни співвідношення фосфоліпідних фракцій синаптосом гіпокампа щурів є вагомою причиною порушення структурно-функціональної активності мембран нейронів, зокрема активності мембранозв'язаних ферментних комплексів.

Відомо, що Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФаза приймає участь у механізмах збудження та створення трансмембранного потенціалу нейронів, виконує суттєву роль в організації відповіді клітини на різноманітні стимули, функціонує за механізмом Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-насосу [10].

На 30-ту добу дії простих поліефірів у дозі 1/100 ДЛ<sub>50</sub> активність Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФази синаптосом головного мозку щурів зни-

Таблиця 1. Вміст фосфоліпідних фракцій синапсом гіпокампа щурів на 30-ту добу дії простих поліефірів у дозі 1/100 ДЛ<sub>50</sub> (M±m; n=10)

Речовина	Фосфатидилхолін	Фосфатидил-етаноламін	Фосфатидил-інозитол	Фосфатидилсерин	Сфінгомієлін
Контроль	48,6±1,4	34,5±1,9	8,9±0,8	4,7±0,3	3,3±0,2
ПГ-2106	52,6±1,5*	31,7±2,5	6,7±0,9*	3,6±0,3*	4,2±0,3*
ГлПГ-1136	53,4±2,1*	33,9±3,8	5,9±0,7*	3,2±0,4*	3,9±0,2*
ПнПГ-700	50,9±4,7	32,8±3,1	7,1±0,8*	4,1±0,5	3,6±0,4

Примітки: 1. Вміст виражений у % від загальної кількості фосфоліпідів, вміст загальних фосфоліпідів у контрольній групі тварин становив (864,7±26,9) нмоль/мг білка, у дослідних групах – в середньому (907,5±35,2) нмоль/мг білка.

2. \*p<0,05 відносно контролю.

жувалася в середньому на 27 % порівняно з контролем (табл. 2).

(табл. 2). Виявлене зменшення активності мембранозв'язаних ферментних комплексів у

Таблиця 2. Активність Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФази у синапсомальній фракції та сукцинатдегідрогенази у мітохондріальній фракції клітин головного мозку щурів на 30-ту добу дії простих поліефірів у дозі 1/100 ДЛ<sub>50</sub> (M±m; n=10)

Речовина	Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -АТФаза, мкмоль P <sub>i</sub> /год·мг білка	Сукцинатдегідрогеназа, мкмоль/год·мг білка
Контроль	13,7 ± 0,61	97,1 ± 4,1
ПГ-2106	9,9 ± 0,76*	72,3 ± 2,8*
ГлПГ-1136	8,6 ± 0,75*	69,5 ± 3,0*
ПнПГ-700	11,4 ± 0,97*	82,1 ± 3,5*

Примітка. \*p<0,05 відносно контролю.

Зниження активності Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФази може вказувати на наявність патологічних процесів у головному мозку щурів при тривалій дії досліджуваних сполук. Оскільки фосфоліпіди займають важливе місце у структурно-функціональній організації транспортних АТФаз, то не виключено, що зміна активності ферменту може бути зумовлена впливом речовин і продуктів їх деструкції на фосфоліпідний склад клітин головного мозку. Відомо, що структурна цілісність субклітинних органел, передусім мітохондрій, також обумовлена ліпідними компонентами. Зміни фізико-хімічного складу значною мірою відображаються на активності їх ферментів. Так, активність сукцинатдегідрогенази в мітохондріальній фракції знижувалася в середньому на 23 % при дії всіх сполук у дозі 1/100 ДЛ<sub>50</sub> порівняно з контролем. Особливо активність цього показника змінювалася під впливом ГлПГ-1136 – на 28 %

головному мозку щурів залежить від зміни їх фосфоліпідного складу.

## Висновки

Тривала дія простих поліефірів на основі пропіленгліколей, гліцеролу та пентолу в дозі 1/100 ДЛ<sub>50</sub> характеризується зміною фосфоліпідного складу, зниженням активності Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФазної системи синапсом і сукцинатдегідрогеназного мембранозв'язаного ферментного комплексу мітохондрій головного мозку щурів. У механізмах біологічної дії простих поліефірів суттєвою ланкою є вплив на ЦНС, який супроводжується мембранотропним ефектом, що викликає дисфункцію внутрішньоклітинного метаболізму. Такі порушення структурно-функціонального стану мембран здатні формувати широкий спектр різних патологічних процесів.

**Список літератури**

1. *Марченко М. М.* Біохімічна біотрансформація ксенобіотиків у організмі / М. М. Марченко, О. В. Кеца, М. М. Великий. – Чернівці : Чернівецький нац. ун-т, 2011. – 280 с.
2. Простые и макроциклические эфиры: научные основы охраны водных объектов / В. И. Жуков, О. В. Зайцева, О. А. Наконечная [и др.]. – Харьков : Торнадо, 2000. – 438 с.
3. *Наконечна О. А.* Біотрансформація простих полієфірів в організмі щурів / О. А. Наконечна, С. О. Стеценко, Л. Г. Пісковська // Матер. XVII Междунар. научн.-техн. конф. «Экология и здоровье человека. Охрана водного и воздушного бассейнов. Утилизация отходов». – Щелкино, АР Крым, 1–5 июня 2009 г. – Харьков, 2009. – Т. 1. – С. 208–211.
4. *Кейтс М.* Техника липидологии / М. Кейтс. – М. : Мир, 1975. – 322 с.
5. *Орехович В. Н.* Современные методы в биохимии / В. Н. Орехович. – М. : Медицина, 1977. – 371 с.
6. *Brockhuse R. M.* Phospholipids structure of erythrocytes and hepatocytes / R.M. Brockhuse // Clin. Biochem. – 1974. – Vol. 14, № 3. – P. 157–158.
7. *Казеннов А. М.* Исследование активности Na, K-АТФазы в эритроцитах млекопитающих / А. М. Казеннов, М. Н. Маслова, А. Д. Шалабодов // Биохимия. – 1984. – № 7. – С. 1089–1094.
8. *Abe K.* Measurement of cellular 3-(4,5-dimethylazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) reduction activity and LDH release using MTT / K. Abe // J. Neurosci. Res. – 1974. – № 38. – P. 325–329.
9. *Зозуля Ю. А.* Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная защита при патологии головного мозга / Ю. А. Зозуля, В. А. Барабой, Д. А. Сутковой. – М. : Знание, 2000. – 344 с.
10. *Болдырев А. А.* Окислительная устойчивость Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФазы / А. А. Болдырев, Е. Г. Курелла, О. В. Тюлина // Доклады АН СССР. – 1995. – Т. 342, № 4. – С. 546–548.

***О.А. Наконечная, С.А. Стеценко, Д.И. Маракушин, И.А. Вишницкая***

**ВЛИЯНИЕ ПРОСТЫХ ПОЛИЭФИРОВ НА ФОСФОЛИПИДНЫЙ СОСТАВ И АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТНЫХ МЕМБРАНОСВЯЗАННЫХ КОМПЛЕКСОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС**

Изучено влияние простых полиэфиров на основе пропиленгликолей, глицерола и пентола на фосфолипидный состав и активность ферментных мембраносвязанных комплексов гиппокампа крыс. Ксенобиотики на 30-е сутки перорального введения в дозе 1/100 ДЛ<sub>50</sub> приводят к изменению содержания фосфолипидных фракций, снижению активности Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФазы синапсом и сукцинатдегидрогеназы митохондрий, что свидетельствует о мембранотропном действии веществ.

**Ключевые слова:** *простые полиэфиры, фосфолипиды, мембраносвязанные комплексы, сукцинатдегидрогеназа.*

***О.А. Nakonechna, S.O. Stetsenko, D.I. Marakushyn, I.A. Wishnytska***

**INFLUENCE OF POLYETHERS ON PHOSPHOLIPID COMPOSITION AND ACTIVITY OF ENZYMATIC MEMBRANE-BOUND COMPLEXES IN RATS BRAIN**

The influence of polyethers based on propylene glycols, glycerol and pentol on the phospholipid composition and enzymatic membrane-bound complex activity in rats brain was studied. On the 30th days xenobiotics at a dose of 1/100 LD<sub>50</sub> caused changes in the phospholipid composition of brain cells and reduced activity of the Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup>-ATP system of synaptosomes and succinate dehydrogenase membrane-bound complex of mitochondria, thereby indicating their membrane-acting effect, dehydrogenase.

**Key words:** *polyethers, phospholipids, membrane-bound complexes.*

*Поступила 10.12.12*