

УДК 577.352'311:347:616.36-018.1-092.9-099:543.395

*Д.І. Маракушин*

*Харківський національний медичний університет*

## **ВПЛИВ ОКСИЕТИЛЬОВАНИХ НОНІЛФЕНОЛІВ НА АКТИВНІСТЬ ДИХАЛЬНОГО ЛАНЦЮГА МІТОХОНДРІЙ ГЕПАТОЦИТІВ ЩУРІВ**

Вивчено швидкість дихання мітохондрій гепатоцитів щурів у присутності специфічних субстратів і інгібіторів НАДН-коензим Q-оксидоредуктази та сукцинат-коензим Q-оксидоредуктази за умов тривалої дії оксиетильованих нонілфенолів (ОЕНФ) у дозі 1/100 ДЛ<sub>50</sub>. Токсифікація щурів ОЕНФ<sub>12</sub> викликає в гепатоцитах зниження активності сукцинат-коензим Q-оксидоредуктази при підвищенні активності НАДН-коензим Q-оксидоредуктази, що підтверджується зменшенням швидкості дихання мітохондрій у станах V<sub>3</sub> та V<sub>4</sub> на сукцинаті на тлі збільшення у цих станах на глутаматі та малаті. За умов дії ОЕНФ<sub>25</sub> спостерігається підвищення активності сукцинат-коензим Q-оксидоредуктази при зниженні активності НАДН-коензим Q-оксидоредуктази, що підтверджується збільшенням швидкості дихання мітохондрій у станах V<sub>3</sub> та V<sub>4</sub> на сукцинаті на тлі зменшення у цих станах на глутаматі та малаті. Досліджувані речовини на 45-ту добу введення щурам призводять до роз'єднання процесів окиснення та фосфорилювання на субстратах II комплексу дихального ланцюга мітохондрій гепатоцитів щурів, що потребує своєчасної та адекватної корекції з метою попередження незворотних змін у печінці.

**Ключові слова:** оксиетильовані нонілфеноли, швидкість дихання мітохондрій, гепатоцити.

Актуальним напрямом сучасної медичної науки є всебічне вивчення впливу хімічних факторів навколишнього середовища на здоров'я людини [1, 2]. Це пов'язане, зокрема, зі значним зростанням синтезу промислових органічних речовин, що мають широке коло застосування [3]. До цих речовин відносяться оксиетильовані нонілфеноли (ОЕНФ), які за фізико-хімічними властивостями та особливостями будови молекул належать до іоногенних детергентів. ОЕНФ широко використовуються в різних галузях народного господарства (як основа промислового випуску пластмас, поліуретанів, миючих засобів, емульгаторів, антикорозійних препаратів, гідравлічних і охолоджуючих речовин тощо), вони надходять до джерел питного водопостачання і тому можуть негативно впливати на організм [4, 5]. Механізми біологічної дії ОЕНФ вивчено недостатньо, а саме їх розкриття є надійною основою для адекватної регламентації їх вмісту в об'єктах довкілля та обґрунтування профілактичних заходів щодо захисту здоров'я населення.

За умов інтоксикації чужорідними хімічними речовинами можуть відбуватися

серйозні порушення стану енергетичного гомеостазу, зокрема активності дихального мітохондріального ланцюга [6, 7]. Основу останнього становить сукупність переносників електронів, вбудованих у внутрішню мембрану цих органел. Переносники електронів організовані, у свою чергу, у чотири комплекси: НАДН-коензим Q-оксидоредуктазний, сукцинат-коензим Q-оксидоредуктазний, коензим Q-цитохром c-оксидоредуктазний, цитохром c-оксидазний [8]. Часто результати щодо стану цих мітохондріальних комплексів у гепатоцитах експериментальних тварин при дії ксенобіотиків досить суперечливі, що свідчить про необхідність проведення додаткових досліджень у цьому напрямі. Активність дихального ланцюга мітохондрій гепатоцитів щурів у випадку тривалого впливу ОЕНФ вивчено недостатньо, а саме її врахування є необхідним для всебічного розкриття механізмів дії та засобів корекції.

Метою даного дослідження було визначення швидкості дихання мітохондрій гепатоцитів щурів у присутності специфічних субстратів і інгібіторів НАДН-коензим Q-оксидоредуктази та сукцинат-коензим Q-окси-

© Д.І. Маракушин, 2016

доредуктази за умов тривалої дії ОЕНФ у дозі 1/100 ДЛ<sub>50</sub>.

**Матеріал і методи.** Використано зразки речовин з регламентованими фізико-хімічними характеристиками: ОЕНФ з числом оксигетильованих груп 12 і 25 (ОЕНФ<sub>12,25</sub>). Експерименти проведено на статевозрілих щурах-самцях лінії WAG масою 180–220 г. Утримання і маніпуляції над тваринами здійснювали відповідно до основних принципів біоетики. Тварин піддавали пероральній заставці за допомогою зонда водними розчинами речовин щоденно одноразово протягом 45 діб у дозі 1/100 ДЛ<sub>50</sub>. Середньолетальні дози (ДЛ<sub>50</sub>) становили для ОЕНФ<sub>12</sub> 3,4 г/кг, для ОЕНФ<sub>25</sub> 9,0 г/кг маси тіла. Тваринам контрольної групи вводили відповідні об'єми питної води. Показники досліджували через 45 діб після початку експерименту. У кожній групі було по 15 тварин. Щурів декапітували, попередньо анестезуючи тіопенталом натрію. Мітохондрії виділяли методом диференційного центрифугування. Для цього спочатку тканину печінки гомогенізували у середовищі, що містило 250 мМ сахарози, 3 мМ трис-НСІ буфер з 0,5 мМ ЕДТА (рН 7,3). Гомогенат центрифугували при 700 g, отриманий супернатант центрифугували у тому ж середовищі при 7000 g. Мітохондріальний осад двічі промивали й знов центрифугували. Активність дихального ланцюга мітохондрій гепатоцитів вивчали полярографічним методом [9]. Функціональний стан I та II комплексів оцінювали

в присутності специфічних субстратів і інгібіторів за параметрами: 1) стан V<sub>4</sub> – високий вміст у середовищі інкубації субстратів I комплексу – 5 мМ глутамату, 5 мМ малату, або субстрату II комплексу – 5 мМ сукцинату при відсутності АДФ; 2) стан V<sub>3</sub> – аналогічні умови, що й у випадку V<sub>4</sub>, але в присутності 200 мкМ АДФ (при цьому фактором, що лімітує швидкість реакції, є саме дихальний ланцюг); 3) стан V<sub>d</sub> – аналогічні умови, що й у випадку V<sub>4</sub>, але в присутності роз'єднувача окиснення та фосфорилування 30 мкМ 2,4-динітрофенолу. Отримані дані статистично обробили з використанням t-критерію Стьюдента, критерію Манна-Уїтні. За критичний рівень значущості приймали p<0,05.

**Результати та їх обговорення.** ОЕНФ<sub>12</sub> на 45-ту добу введення статистично достовірно (p<0,001) при порівнянні з контролем знижував швидкість дихання мітохондрій гепатоцитів щурів у стані V<sub>3</sub> на сукцинаті (субстраті II комплексу) в середньому в 1,5 раза (таблиця). Для стану V<sub>4</sub> на тому ж субстраті виявлялася аналогічна, але менш виразна (в 1,4 раза, p=0,0026) динаміка змін за умови дії цієї речовини. Протилежні зміни реєструвалися для станів V<sub>3</sub> та V<sub>4</sub> на глутаматі та малаті (субстратах I комплексу дихального ланцюга). Так, на 45-ту добу дії ОЕНФ<sub>12</sub> у дозі 1/100 ДЛ<sub>50</sub> для стану V<sub>3</sub> спостерігалось статистично значуще (p=0,0045) по відношенню до контрольної групи тварин підвищення швидкості дихання мітохондрій гепатоцитів

*Швидкість дихання мітохондрій гепатоцитів щурів на 45-ту добу впливу оксигетильованих нонілфенолів у дозі 1/100 ДЛ<sub>50</sub>*

Показник	Контроль	ОЕНФ <sub>12</sub>	ОЕНФ <sub>25</sub>
Стан 3 (V <sub>3</sub> ) на сукцинаті	6,29±0,954	4,16 [3,90; 4,40] p<0,001	7,5 [6,64; 8,36] p=0,0045
Стан 3 (V <sub>3</sub> ) на глутаматі та малаті	3,51±0,789	4,79 [3,55; 6,34] p=0,0045	2,48 [2,05; 3,48] p=0,007
Стан 4 (V <sub>4</sub> ) на сукцинаті	1,78±0,469	1,26 [1,07; 1,43] p=0,0026	1,87 [1,60; 2,54] p=0,089
Стан 4 (V <sub>4</sub> ) на глутаматі та малаті	0,81±0,196	0,97±0,192 p=0,046	0,77 [0,56; 0,90] p=0,29
Стан у присутності 2,4-динітрофенолу (V <sub>d</sub> ) на сукцинаті	7,42±1,743	3,99 [2,71; 5,02] p<0,001	6,22±1,029 p=0,049
Стан у присутності 2,4-динітрофенолу (V <sub>d</sub> ) на глутаматі та малаті	3,55 [2,86; 3,71]	3,05±0,621 p=0,071	3,81 [3,06; 4,15] p=0,395

*Примітка.* p – рівень значущості порівняно з контролем.

шурів у середньому в 1,4 раза. Для стану  $V_4$  на субстраті I комплексу дихального ланцюга мітохондрій швидкість споживання кисню збільшувалася ( $p=0,046$ ) за дії ОЕНФ<sub>12</sub> у середньому в 1,2 раза.

Тривала дія ОЕНФ<sub>25</sub> у дозі 1/100 ДЛ<sub>50</sub> (за значенням ДЛ<sub>50</sub> ця речовина серед досліджуваних є найменш токсичною) супроводжувалася, навпаки, деяким підвищенням швидкості дихання мітохондрій гепатоцитів шурів у станах  $V_3$  та  $V_4$  на субстраті II комплексу в середньому в 1,2 раза ( $p=0,0045$ ) та 1,1 раза ( $p=0,089$ ), а на субстратах I комплексу – зниженням в 1,4 ( $p=0,007$ ) та 1,1 ( $p=0,29$ ) раза відповідно. Такі зміни скоріше носять пристосувально-компенсаторний характер.

На 45-ту добу дії речовин у дозі 1/100 ДЛ<sub>50</sub> спостерігалось також зниження порівняно з контролем інтенсивності дихання мітохондрій гепатоцитів шурів у стані, що характеризується присутністю 2,4-динітрофенолу на сукцинаті в середньому в 1,9 раза для ОЕНФ<sub>12</sub> ( $p<0,001$ ) та 1,2 раза для ОЕНФ<sub>25</sub> ( $p=0,049$ ). Інтенсивність споживання кисню мітохондріями гепатоцитів шурів у стані на глутаматі та малаті з присутнім 2,4-динітрофенолом при дії речовин практично не відрізнялася від контролю.

У цілому отримані результати дозволяють стверджувати про порушення стану дихального ланцюга мітохондрій гепатоцитів шурів у разі тривалої їх токсифікації досліджуваними речовинами. Особливо це виражено зниженням активності сукцинат-коензим Q-оксидоредуктази (II комплексу дихального ланцюга) при дії ОЕНФ<sub>12</sub> на тлі підвищення активності НАДН-коензим Q-оксидоредуктази (I комплексу дихального ланцюга). З іншого боку, доведено, що I комплекс дихального ланцюга мітохондрій може сприяти реакції одноелектронного відновлення кисню до супероксидного аніону [7, 10] – фактора ініціювання вільнорадикальних реакцій з наступним пошкодженням мембран, у тому числі й мітохондріальних. За умов нормального функціонування печінки активність цієї реакції пригнічується завдяки дії антиоксидантів. Підвищення активності I комплексу дихального ланцюга мітохондрій гепатоцитів шурів у разі тривалого впливу ОЕНФ<sub>12</sub> може бути пов'язане з порушенням транспорту електронів цим комплексом, що може супроводжуватися утворенням значної кількості токсичних супероксидних аніонів. Протилежні

зміни, виявлені у разі тривалого впливу ОЕНФ<sub>25</sub>, скоріше носять пристосувально-компенсаторний характер. Крім того, результати проведених досліджень дозволили виявити в досліджуваних речовинах властивість роз'єднувати процеси окиснення і фосфорилювання на субстратах II комплексу дихального ланцюга мітохондрій гепатоцитів шурів.

#### Висновки

1. У механізмі тривалої дії ОЕНФ з числом оксиетильованих груп 12 і 25 у дозі 1/100 ДЛ<sub>50</sub> на організм шурів суттєвою ланкою є негативний вплив на стан енергетичного гомеостазу, що підтверджується порушенням активності дихального ланцюга мітохондрій гепатоцитів.

2. Тривала токсифікація шурів ОЕНФ<sub>12</sub> у дозі 1/100 ДЛ<sub>50</sub> викликає в гепатоцитах шурів зниження активності сукцинат-коензим Q-оксидоредуктази (II комплексу дихального ланцюга) при підвищенні активності НАДН-коензим Q-оксидоредуктази (I комплексу), що підтверджується зменшенням швидкості дихання мітохондрій у станах  $V_3$  та  $V_4$  на сукцинаті на тлі збільшення у цих станах на глутаматі та малаті.

3. Тривала токсифікація шурів ОЕНФ<sub>25</sub> у дозі 1/100 ДЛ<sub>50</sub> викликає в гепатоцитах шурів підвищення активності сукцинат-коензим Q-оксидоредуктази (II комплексу дихального ланцюга) при зниженні активності НАДН-коензим Q-оксидоредуктази (I комплексу), що підтверджується збільшенням швидкості дихання мітохондрій у станах  $V_3$  та  $V_4$  на сукцинаті на тлі зменшення у цих станах на глутаматі та малаті.

4. Досліджувані речовини на 45-ту добу введення шурам у дозі 1/100 ДЛ<sub>50</sub> призводять до роз'єднання процесів окиснення та фосфорилювання на субстратах II комплексу дихального ланцюга мітохондрій гепатоцитів шурів.

5. Порушення активності дихального ланцюга мітохондрій гепатоцитів шурів за умов тривалого впливу оксиетильованих нонілфенолів потребує своєчасної та адекватної корекції з метою попередження незворотних змін у печінці.

**Перспективи подальших досліджень.** Планується продовжити комплекс досліджень, спрямованих на обґрунтування впливу речовин на організм теплокровних тварин з метою визначення їх потенційної небезпеки та нормування.

## Література

1. Белозерова С.М. Особенности формирования заболеваемости в условиях индустриального труда и новых технологий / С.М. Белозерова // Медицина труда и промышленная экология. – 2011. – № 3. – С. 13–19.
2. Оценка воздействия химического загрязнения окружающей среды как фактора риска для здоровья человека: аналитический обзор / Н.Ю. Келина, Н.В. Безручко, Г.К. Рубцов, С.Н. Чичкин // Вестник ТГПУ. – 2010. – Вып. 3 (93). – С. 156–161.
3. Аманжол И.А. Реакция организма на воздействие вредных производственных факторов: оценка профессионального риска / И.А. Аманжол, З.Т. Мухаметжанова, Д.С. Абитаев. – Lambert Academic Publishing, 2013. – 116 с.
4. Детергенти сучасності: технологія виробництва, екологія, економіка використання / В.А. Бурлака, Г.Б. Руденко, І.Г. Грабар, А.Д. Біба. – Житомир: ЖДТУ, 2004. – 745 с.
5. Научные основы обоснования прогноза потенциальной опасности детергентов в связи с регламентацией в воде водоемов / А.Я. Цыганенко, В.И. Жуков, Н.Г. Щербань и др. – Белгород, 2001. – 442 с.
6. Лукьянчук В.Д. Влияние ОК-7 на состояние энергетического обмена у животных с мозговым инсультом / В.Д. Лукьянчук, И.А. Житина // Научные ведомости Белгородского гос. ун-та. Серия: Медицина. Фармация. – 2013. – Вып. 25 (168), Т. 24. – С. 154–160.
7. Губский Ю.И. Смерть клетки: свободные радикалы, некроз, апоптоз / Ю.И. Губский. – Винница: Нова книга, 2015. – 360 с.
8. Биохимия / под. ред. Е.С. Северина. – Москва: ГЭОТАР-МЕДИА, 2009. – 768 с.
9. Справочник биохимика / Р. Досон, Д. Эллиот, У. Эллиот и др. – Москва: Мир, 1991. – 543 с.
10. Скулачев В.П. Явление запрограммированной смерти. Митохондрии, клетки и органы: роль активных форм кислорода / В.П. Скулачев // Соросовский образовательный журнал. – 2001. – № 7. – С. 4–10.

### *Д.И. Маракушин*

#### **ВЛИЯНИЕ ОКСИЭТИЛИРОВАННЫХ НОНИЛФЕНОЛОВ НА АКТИВНОСТЬ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ МИТОХОНДРИЙ ГЕПАТОЦИТОВ КРЫС**

Изучена скорость дыхания митохондрий гепатоцитов крыс в присутствии специфических субстратов и ингибиторов НАДН-коэнзим Q-оксидоредуктазы и сукцинат-коэнзим Q-оксидоредуктазы в результате длительного действия оксиэтилированных нонилфенолов (ОЭНФ) в дозе 1/100 ДЛ<sub>50</sub>. Токсификация крыс ОЭНФ<sub>12</sub> вызывает в гепатоцитах снижение активности сукцинат-коэнзим Q-оксидоредуктазы при повышении активности НАДН-коэнзим Q-оксидоредуктазы, что подтверждается уменьшением скорости дыхания митохондрий в состояниях V<sub>3</sub> и V<sub>4</sub> на сукцинате на фоне увеличения в этих состояниях на глутамате и малате. В результате действия ОЭНФ<sub>25</sub> наблюдается повышение активности сукцинат-коэнзим Q-оксидоредуктазы при снижении активности НАДН-коэнзим Q-оксидоредуктазы, что подтверждается увеличением скорости дыхания митохондрий в состояниях V<sub>3</sub> и V<sub>4</sub> на сукцинате на фоне уменьшения в этих состояниях на глутамате и малате. Исследуемые вещества на 45-е сутки введения крысам приводят к разобщению процессов окисления и фосфорилирования на субстратах II комплекса дыхательной цепи митохондрий гепатоцитов крыс, что требует своевременной и адекватной коррекции с целью предупреждения необратимых изменений в печени.

**Ключевые слова:** оксиэтилированные нонилфенолы, скорость дыхания митохондрий, гепатоциты.

### *D.I. Marakushin*

#### **INFLUENCE OF OXYETHYLIZED NONYLPHENOLS ON THE ACTIVITY OF RESPIRATORY CHAIN MITOCHONDRION OF RATS HEPATOCYTES**

The rate of mitochondrion respiration of rats hepatocytes was studied at the presence of specific substrate and inhibitors of NADH-coenzyme Q-oxidoreductase and succinate-coenzyme Q-oxidoreductase under the long-term influence of oxyethylized nonylphenols (OENP) at a dose of 1/100 LD<sub>50</sub>. Toxicification of rats by OENP<sub>12</sub> causes a decrease of succinate-coenzyme Q-oxidoreductase activity in hepatocytes against the background of an increase of NADH-coenzyme Q-oxidoreductase, that is confirmed by the decrease of mitochondrion respiration rate at the state V<sub>3</sub> and V<sub>4</sub> on succinate against the background of its increase

---

on glutamate and malate. In the issue of OENP<sub>25</sub> influence it is observed an increase of succinate-coenzyme Q-oxidoreductase activity and a decrease of NADH-coenzyme Q-oxidoreductase, that is confirmed by the increase of mitochondrion respiration rate at the state V<sub>3</sub> and V<sub>4</sub> on succinate against the background of its decrease on glutamate and malate. Investigated compounds cause an uncoupling of oxidation and phosphorylation processes on substrate of II complex of respiratory chain of mitochondrion of rats hepatocytes, that requires modern and adequate correction for prevention of irreversible changes in the liver.

**Key words:** *oxyethylized nonylphenols, rate respiratory of mitochondrions, hepatocytes.*

*Поступила 11.02.16*