

УДК 544.725.2:543.395:616-099-092.9

*М.Г. Щербань, В.І. Жуков, О.В. Ніколаєва, М.О. Кучерявченко,
О.Ю. Литвиненко*

Харківський національний медичний університет

ВПЛИВ ЛАПРОКСИДУ МАРКИ Л-303 НА СТРУКТУРНО-МЕТАБОЛІЧНИЙ СТАН МЕМБРАН В УМОВАХ ПІДГОСТРОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ

Вивчено метаболічний стан клітинних мембран гепатоцитів в умовах підгострої субтоксичної дії на організм теплокровних тварин лапроксиду Л-303 в дозах 1/10, 1/100 та 1/1000 ДЛ₅₀. Встановлено, що лапроксид Л-303 в дозі 1/100 ДЛ₅₀ активує окислювально-відновлювальні процеси в гепатоцитах, які супроводжуються генерацією активних форм кисню в мітохондріальному дихальному електронно-транспортному ланцюгу переносу електронів і протонів, що може супроводжуватися підвищенням вільнорадикальних процесів і перекисного окиснення ліпідів. У значно більшій дозі (1/10 ДЛ₅₀) лапроксид пригнічував біоенергетичні, синтетичні процеси і знешкоджував чужорідні хімічні сполуки. Комплексна оцінка структурно-метаболічного стану плазматичних, мітохондріальних і мікосомальних мембран свідчить про розвиток мембранної патології, яка супроводжується багаточисельними порушеннями метаболічних процесів і розвитком гіпоксичних станів, що лежать в основі структурних клітинних розладів. В дозі 1/1000 ДЛ₅₀ лапроксид Л-303 не впливає на структурно-функціональний стан плазматичних, мітохондріальних і мікосомальних мембран.

Ключові слова: *ксенобіотики, клітинні мембрани, гепатоцити.*

На сучасному етапі кризового стану біосфери виник значний розрив між реальною здатністю цивілізації створювати новий хімічний потенціал і обмеженими можливостями у вирішенні проблеми охорони навколишнього середовища. Аналіз сучасного стану забруднення навколишнього середовища свідчить про те, що сформувалася критична ситуація, при якій безконтрольне використання хімічних сполук і їх комплексів може мати невинуваті наслідки для здоров'я населення [1]. Багаточисельні дослідження свідчать про зростання екологічно-обумовлених захворювань і патологічних станів [1, 2]. Це в повній мірі може бути віднесено і до епоксидвмісних простих поліефірів, які мають назву лапроксиди. По своїй хімічній структурі дані синтетичні сполуки мають простий ефірний зв'язок, гідрофільні групи і гідрофобні радикали, що забезпечує їм властивості поверхнево-активних речовин (ПАР).

Необхідно відмітити, що виробництво простих поліефірів є різноманітним за асортиментом. З кожним роком з'являються нові марки поліефірів з регламентованими фі-

зико-хімічними властивостями. Це надлегкі термо-, кислото- і лугостійкі поліуретани, пластмаси, епоксидні смоли, лаки, емалі та ін. За масштабами застосування і об'єму світового виробництва прості поліефіри займають друге місце після детергентів [1–4]. Вони використовуються в нафтодобувній, нафтопереробній, гірничодобувній, машинобудівній, електрохімічній промисловості в якості як кінцевих, так і проміжних продуктів для отримання багаточисельних виробів, засобів і продуктів, у тому числі і ПАР.

Метою дослідження було вивчення впливу лапроксиду марки Л-303 в дозах 1/10, 1/100 та 1/1000 ДЛ₅₀ на метаболічний стан клітинних мембран в умовах підгострої субтоксичної дії на організм теплокровних тварин.

Матеріал і методи. Вибір лапроксиду марки Л-303 було обґрунтовано великими обсягами виробництва, широким контактом з населенням та відсутністю прогностичної оцінки потенційної безпеки для теплокровних тварин. Даний простий поліефір представляє собою тригліцидиловий ефір поліоксипропілентріолу (Л-303), молекулярної маси 300. По

© М.Г. Щербань, В.І. Жуков, О.В. Ніколаєва та ін., 2016

агрегатному стану це в'язка, прозора рідина, добре розчинна в ефірі, спиртах, толуолі, бензолі. У воді утворює стійку емульсію. За параметрами гострої токсичності Л-303 відноситься до малотоксичних сполук, яким притаманні слабкі кумулятивні властивості. Середньолетальна доза (ДЛ₅₀) для білих щурів і мишей була встановлена відповідно на рівнях 5,75 і 5,63 г/кг маси тварин.

Програма дослідження передбачала проведення підгострого токсикологічного експерименту на статевозрілих білих щурах популяції Вістар масою 190–200 г, тривалістю 45 діб. Тварини щоденно вранці натщесерце пероральним шляхом за допомогою металевого зонда отримували водні розчини лапроксиду із розрахунку 1/10, 1/100 і 1/1000 ДЛ₅₀. Контрольна група тварин отримувала відповідні об'єми питної води. В кожній групі налічувалось по 10 тварин. Всі етапи наукового експерименту виконувалися відповідно до національних «Загальних етичних принципів досліджень на тваринах» (Україна, 2001), які узгоджуються з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних і інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Відповідно до мети і завдань дослідження в плазматичних мембранах гепатоцитів вивчалася активність ферментів 5'-нуклеотидази, Na⁺-, K⁺-АТФази, лужної фосфатази (ЛФ); в мітохондріальних мембранах визначалася активність моноамінооксидази (МАО), сукцинатдегідрогенази (СДГ) і цитохромоксидази (ЦХО); в мікросомальних мембранах ендоплазматичного ретикулулу визначалася активність глюкозо-6-фосфатази (Г-6-Фази), НАД•Н-дегідрогенази, Ca²⁺-АТФази і Mg²⁺-АТФази [5–8].

5'-нуклеотидаза здійснює гідроліз АМФ з утворенням неорганічного фосфату, який визначали колориметричним методом при довжині хвилі 680 нм по Фіске–Суббароу. Na⁺-, K⁺-АТФаза активність визначалася як різниця значення активності в середовищі з оубаїном і без нього. Для виявлення неорганічного фосфату забарвлювали середовище в синій колір по Фіске–Суббароу. Активність ЛФ визначали по кількості вивільненого п-нітрофенолу при розщепленні п-нітрофенілфосфату на ортофосфат і п-нітрофенол, який визначали фотометричним методом у лужному середовищі при λ = 405 нм. В основі методу визначення активності МАО лежить зміна кількості

утвореного альдегіду при ферментативному дезамінуванні п-нітрофенілетиламіну [5]. Для визначення ЦХО використовували спектрофотометричний метод і реакцію окислення N-диметилпарафенілдіаміну. СДГ зв'язана з внутрішньою мембраною мітохондрій і представляє собою флавопротеїд, визначення якого проводилось спектрофотометричним методом. Глюкозо-6-фосфатаза мікросомальної фракції ендоплазматичного ретикулулу гідролізує Г-6-фосфат на глюкозу і неорганічний фосфат. Принцип методу визначення активності даного ферменту заснований на кількості вивільненого в результаті гідролізу неорганічного фосфату. Активність НАД•Н-дегідрогенази визначали спектрофотометричним методом по зміні оптичної щільності при λ = 340 нм, характерній для відновленого НАД•Н [5, 6].

Ca²⁺-, Mg²⁺-залежні АТФази здійснюють гідроліз АТФ при активному транспорті іонів Ca²⁺ і Mg²⁺ в саркоплазматичному ретикулулі. В основі методу лежить визначення Нф, який вивільняється при гідролізі АТФ ферментом. Неорганічний фосфат з молібденовою кислотою утворює комплексне сполучення, яке легко відновлюється у синій колір. Спектрофотометрування здійснювали при λ = 680 нм проти проби, що не вмішувала білок [5, 6].

При виділенні плазматичних мітохондріальних і мікросомальних мембран використовували загальноприйняті методи – гомогенізацію наважки печінки, диференціальне і градієнтне центрифугування гомогенатів [5, 6].

Отримані результати статистично обробили з використанням критерію Стьюдента–Фішера.

Результати. Результати дослідження плазматичних мембран гепатоцитів щурів, що піддавалися токсифікації в підгострому експерименті, виявили значні динамічні зміни в активності маркерних ферментів 5'-нуклеотидази, Na⁺-, K⁺-АТФази і лужної фосфатази (таблиця).

Так, доза 1/100 ДЛ₅₀ підвищувала активність 5'-нуклеотидази, Na⁺-, K⁺-АТФази і ЛФ відповідно на 24,76; 22,60 та 30,56 %. Проте токсифікація тварин 1/10 ДЛ₅₀ приводила до зниження активності 5'-нуклеотидази, Na⁺-, K⁺-АТФази і ЛФ відповідно на 53,73; 55,81 та 42,80 %. Ці дані свідчать, що лапроксид Л-303 в дозі 1/100 ДЛ₅₀ активує метаболічні процеси в плазматичних мембранах гепатоцитів, які можуть бути поєднані з підви-

Показники структурно-метаболічного стану гепатоцитів
в умовах підгострої токсифікації щурів на 45-ту добу експерименту

Показник	Група, ДЛ ₅₀ М±m			
	контроль	1/10	1/100	1/1000
5'-нуклеотидаза, нмоль Рн / мг білка·1 хв	135,7±12,4	62,8±5,3*	169,3±8,8*	142,3±10,08
Na ⁺ -, K ⁺ -АТФаза, нмоль Р / мг білка·1 хв	128,3±6,5	56,7±4,9*	157,3±9,4*	132,6±8,7
Лужна фосфатаза, нмоль п-нітрофенолу / мг білка·1 хв	74,6±5,3	43,2±3,8*	97,4±5,6*	79,5±6,2
Моноамінооксидаза, нмоль NH ₃ / мг білка·1 хв	28,5±2,8	15,2±1,3*	68,5±4,7*	31,7±2,5
ЦХО, нмоль окисленого N, N-ДФДА / мг білка·1 хв	437,4±21,7	210,6±9,5*	486,2±23,5*	442,8±20,6
СДГ, нмоль окисленого сукцинату / мг білка·1 хв	46,2±4,5	20,3±1,6*	61,8±4,7*	47,5±3,3
Г-6-фосфатаза, нмоль Рн / мг білка·1 хв	97,4±6,3	35,7±2,8*	127,3±8,2*	93,8±5,6
НАДН·Н-дегідрогеназа, мкмоль НАДН / мг білка·1 год	22,5±3,1	10,9±1,2*	33,6±2,5*	23,7±2,4
Ca ²⁺ -АТФаза, нмоль Рн / мг білка·1 хв	152,6±11,7	174,8±7,5*	183,7±9,3*	150,3±12,2
Mg ²⁺ -АТФаза, нмоль Рн / мг білка·1 хв	148,3±13,5	148,3±13,5	178,6±8,5*	146,7±9,13

Примітка. * p<0,05.

щенням транспортної і рецепторної функції. За таких умов слід очікувати, що ксенобіотик в дозі 1/100 ДЛ₅₀ при підгострій токсифікації здатний прискорювати і внутрішньоклітинний метаболізм.

Оцінка структурно-метаболічного стану мітохондріальних мембран виявила підвищення активності моноамінооксидази під впливом 1/100 ДЛ₅₀ на 140,35 %, цитохром-оксидази на 11,15 % і сукцинатдегідрогенази на 33,76 %. Ці дані свідчать, що лапроксид Л-303 у дозі 1/100 ДЛ₅₀ значно прискорює процеси дезамінування біогенних моноамінів (серотоніну, гістаміну, адреналіну, норадреналіну та ін.), окиснення сукцинату до фумарату, транспорт електронів та окислювальне фосфорилування в дихальному ланцюзі.

Аналіз оціночних показників мембран мікросом ендоплазматичного ретикулу гепатоцитів виявив підвищення активності глюкозо-6-фосфатази на 30,69 %, НАД·Н-дегідрогенази на 49,33 %, Ca²⁺-, Mg²⁺-залежної АТФази відповідно на 20,38 і 20,43 % у тварин, токсифікованих 1/100 ДЛ₅₀. Результати показують, що у цій дозі лапроксид активує синтетичні процеси знешкодження неполярних токсичних речовин. Поряд з тим, необхідно відмітити, що активація механізмів знешкодження ксенобіотиків у монооксигеназній системі мікросом може бути поєднана з утворенням більш токсичних і небезпечних метаболітів, здатних потенціювати розвиток віддалених наслідків мутагенезу, канцерогенезу, атерогенезу та ін.

В дозі 1/10 ДЛ₅₀ лапроксид Л-303 пригнічував активність Г-6-Фази у мікротомах гепа-

тоцитів на 63,35 %, НАД·Н-дегідрогенази на 51,56 %, Ca²⁺-, Mg²⁺-АТФази відповідно на 50,99 і 45,22 %, що свідчило про зниження анаболічної і детоксикаційної функції печінки.

В дозі 1/1000 ДЛ₅₀ лапроксид не впливав на структурно-метаболічний стан плазматичних, мітохондріальних і мікросомальних мембран гепатоцитів, що дозволяє вважати дану дозу як недіючу в підгострому токсикологічному експерименті.

Обговорення результатів. Тривала субтоксична дія лапроксиду Л-303 в дозі 1/10 ДЛ₅₀ значно пригнічувала активність цитоплазматичних мембран гепатоцитів, що може вказувати на структурно-метаболічні розлади та порушення фізико-хімічних властивостей цих складних надмолекулярних структур. Аналіз літературних джерел показує, що дисфункція плазматичних мембран тісно пов'язана з формуванням багаточисельних порушень обміну речовин і енергії, в тому числі з розвитку можливих віддалених наслідків токсичної дії ксенобіотиків [1–4].

Ксенобіотик у меншій дозі активує біоенергетичні процеси, які можуть бути поєднані з підвищенням синтезу АТФ, необхідного для відновлювальних процесів. Дослідження структурно-метаболічного стану мітохондріальних мембран гепатоцитів в умовах токсифікації організму 1/100 ДЛ₅₀ дають змогу судити про значну напругу захисно-приспосувальних механізмів, що спрямовані на забезпечення гомеостатичної функції організму. Лапроксид Л-303 в дозі 1/10 ДЛ₅₀ пригнічував активність мітохондріальних мембран по закінченні підгострої токсифікації,

що знайшло віддзеркалення у зниженні активності MAO, ЦХО та мембраноз'язаного ферменту СДГ. Така динаміка активності мітохондріальних ферментів під впливом 1/10 ДЛ₅₀ вказує на пригнічення у даній дозі процесів окислювального дезамінування і біоенергетичного гомеостазу, що може розцінюватися як зрив захисно-приспосувальних механізмів і адаптації в умовах тривалої субтоксичної дії ксенобіотика.

Висновки

1. Лапроксид Л-303 у дозі 1/100 ДЛ₅₀ активує окислювально-відновлювальні процеси в гепатоцитах, які супроводжуються генерацією активних форм кисню в мітохондріальному дихальному електронно-транспортному ланцюгу переносу електронів і протонів, що може супроводжуватися підвищенням вільнорадикальних процесів і перекисного окиснення ліпідів.

2. У значно більшій дозі – 1/10 ДЛ₅₀ – лапроксид пригнічував біоенергетичні, синте-

тичні процеси і знешкодження чужорідних хімічних сполук.

3. В дозі 1/1000 ДЛ₅₀ лапроксид Л-303 не впливає на структурно-функціональний стан плазматичних, мітохондріальних і мікросомальних мембран.

4. Комплексна оцінка структурно-метаболічного стану плазматичних, мітохондріальних і мікросомальних мембран свідчить про розвиток мембранної патології, яка супроводжується багаточисельними порушеннями метаболічних процесів і розвитком гіпоксичних станів, що лежать в основі структурних клітинних розладів.

Перспективність дослідження. Відомо, що ПАР здатні при тривалому надходженні до організму, навіть у незначних субтоксичних дозах, моделювати радіобіологічні ефекти, пригнічувати систему антирадикального і антиперекисного захисту, формувати імунологічну недостатність, що є причиною подальшого вивчення впливу цих речовин.

Література

1. Биохимические аспекты экологической патологии, связанной с химическим загрязнением поверхностных источников водоснабжения / Н.Г. Щербань, В.И. Жуков, В.В. Мясоедов, Ю.К. Резуненко. – Харьков: Раритеты Украины, 2011. – 176 с.

2. Щербань Н.Г. Оценка рисков здоровья населения от опасных отходов (биохимические аспекты) / Н.Г. Щербань, В.И. Жуков, В.В. Мясоедов. – Харьков: Апостроф, 2010. – 156 с.

3. Биохимические механизмы радиомиметических эффектов поверхностно-активных веществ / Н.Г. Щербань, В.И. Жуков, В.В. Мясоедов, В.А. Капустник. – Харьков: Раритеты Украины, 2012. – 120 с.

4. Регіональна система організації оздоровлення населення на рекреаційних водоймах / М.Г. Щербань, В.В. М'ясоедов, В.А. Капустник та ін. – Харків: ХНМУ, 2014. – 212 с.

5. Рибальченко В.К. Структура й функції мембран / В.К. Рибальченко, М.М. Коганов. – К.: Вища шк., 1988. – 312 с.

6. Современные методы в биохимии / под ред. акад. АМН СССР В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – 371 с.

Н.Г. Щербань, В.И. Жуков, О.В. Николаева, М.А. Кучерявченко, Е.Ю. Литвиненко

ВЛИЯНИЕ ЛАПРОКСИДА Л-303 НА СТРУКТУРНО-МЕТАБОЛИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ МЕМБРАН В УСЛОВИЯХ ПОДОСТРОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Изучено метаболическое состояние клеточных мембран гепатоцитов в условиях подострого субтоксического действия на организм теплокровных животных лапроксида Л-303 в дозах 1/10, 1/100 и 1/1000 ДЛ₅₀. Установлено, что лапроксид Л-303 в дозе 1/100 ДЛ₅₀ активизирует окислительно-восстановительные процессы в гепатоцитах, которые сопровождаются генерацией активных форм кислорода в митохондриальной дыхательной электронно-транспортной цепи переноса электронов и протонов, что может сопровождаться усилением свободнорадикальных процессов и перекисного окисления липидов. В значительно большей дозе – 1/10 ДЛ₅₀ – лапроксид угнетает биоэнергетические, синтетические процессы и обезвреживание чужеродных химических соединений. Комплексная оценка структурно-метаболического состояния плазматических, митохондриальных и микросомальных мембран свидетельствует о развитии мембранной патологии, которая сопровождается многочисленными нарушениями метаболических процессов и развитием гипоксических состояний, лежащих в основе структурных клеточных нарушений. Лапроксид Л-303 в дозе 1/1000 ДЛ₅₀ не влияет на структурно-функциональное состояние плазматических, митохондриальных и микросомальных мембран.

Ключевые слова: ксенобіотики, клітинні мембрани, гепатоцити.

N.G. Scherban, V.I. Zhukov, O.V. Nikolaeva, M.A. Kucheriavchenko, E.Yu. Litvinenko
**INFLUENCE OF LAPROXIDE L-303 ON STRUCTURAL-METABOLIC STATE MEMBRANES UNDER
SUBACUTE INTOXICATION**

Studied the metabolic state of the cell membranes of hepatocytes in a subacute subtoxic influence on the body of warm-blooded animals of laproxide L-303 in 1/10, 1/100 and 1/1000 DL₅₀. It was found that the laproxide L-303 in 1/100 DL₅₀ activates redox processes in hepatocytes, which are accompanied by the generation of active oxygen forms in mitochondrial respiratory electron transport chain electron and proton transfer which can be accompanied by increased free radical processes and lipid peroxidation. In a much larger dose, 1/10 DL₅₀ laproxide inhibits bioenergy, synthetic processes and neutralization of foreign chemicals. Complex assessment the structural and metabolic status of plasmatic, mitochondrial and microsomal membranes shows the development of the membrane pathology, which is accompanied by numerous violations of the metabolic processes and the development of hypoxic conditions, that is the basis of structural cell disorders. The 1/1000 DL₅₀ laproxide L-303 does not influence on the structural and functional state of the plasmatic, mitochondrial and microsomal membranes.

Key words: *xenobiotics, cell membranes, hepatocytes.*

Поступила 08.04.16