**Горбач Т.В.1, Денисенко С.А.1, Жерновая М.Є.2, Шевченко О.О.1,**

**Артюгіна Л.І.1**

*1Харківський національний медичний університет (м. Харків)*

*2Луганський державний медичний університет (м. Рубіжне)*

**ТРИВАЛИЙ СУБТОКСИЧНИЙ ВПЛИВ ПОЛІОКСИПРОПІЛЕНГЛІКОЛЮ МОЛЕКУЛЯРНОЇ МАСИ 500 НА МІКРОСОМАЛЬНУ ГІДРОКСИЛЮЮЧУ СИСТЕМУ ГЕПАТОЦИТІВ В ПІДГОСТРОМУ ЕКСПЕРИМЕНТІ**

         **Вступ**

Стрімкий розвиток хімічної, нафтопереробної, фармацевтичної, металургійної, машинобудівної й гірничобудівної промисловості, інтенсивна хімізація сільського господарства та використання в побуті великого асортименту хімічних засобів створюють загрозу глобального забруднення навколишнього середовища [1, 2]. Існують багаточисельні приклади інтенсив-ного забруднення виробничих цехів, територій, повітря, водойм і грунту, які свідчать про шкідливий вплив, що може бути нанесений здоров’ю населення й зниженню загальної популяційної резистентності організму. Основними хімічними антропогенними забруднювачами за останні 20 років стали, нафтохімічні й нафтопереробні комбінати, а також підприємства хімії органічного синтезу, об’єм та асортимент продукції яких постійно зростає, що створює реальну загрозу здоров’ю населення [3, 4]. В умовах підвищеного хімічного навантаження на біосферу важливою й актуальною проблемою є рання діагностика екологічно обумовлених патологічних станів і захворювань. Методологічною основою при цьому можуть бути розробка й впровадження в практичну медицину донозологічних скринінгових тестів визначення молекулярної мембранної патології, яка формує ознаки маніфестного перебігу хвороби або патологічного стану [1, 2]. Багаточисельні дослідження свідчать, що критеріально-значущі показники оцінки гомеостатичної функції організму базуються на глибокому вивченні патологічних основ структурно-метаболічних порушень, які виникають в умовах тривалої й скритої субтоксичної дії ксенобіотиків [1, 2]. Відомо, що  механізми біологічної дії багатьох груп і класів хімічних сполук (пестициди, гербіциди, альдегіди, кетони, детергенти, окиснювачі, спирти, прості й складні ефіри) у більшій або меншій мірі достатньо добре вивчені. На цьому базується сучасна профілактична медицина й антидотна терапія. Проте, патогенетичні й структурно-метаболічні механізми формування порушень під впливом багатьох класів хімічних сполук залишаються зовсім невивченими. Це в повній мірі відноситься й до поліоксипропіленгліколю молекулярної маси 500, який широко застосовується в різних галузях народного господарства для виробництва, пластмас, пінопластів, поліуретанів, епоксидних смол та ін. [1–4]. Відсутність прогностичної характеристики потенційної безпеки диктує необхідність глибокого вивчення механізмів біологічної дії й розвитку структурно-метаболічних порушень в організмі під впливом тривалої дії субтоксичних доз ксенобіотиків і в першу чергу – зовсім недосліджених. Виходячи з цього, метою дослідження було вивчення впливу тривалих субтоксиних доз поліоксипропіленгліколю молекулярної маси 500 на детоксикаційну функцію печінки в умовах підгострого експерименту й обґрунтування критеріально-значущих показників порушення гомеостатичної функції.

**Матеріали та методи дослідження**

Вибір поліоксипропіленгліколю молекулярної маси 500, що має товарну назву «Лапрол» – Л-502-2-10 було обґрунтовано значними обсягами виробництва, широким контактом з населенням і необхідністю вивчення патохімічних механізмів розвитку структурно-метаболічних порушень під впливом субтоксичних доз ксенобіотика. Л-502-2-10 являє собою олігомер у вигляді в’язкої, прозорої рідини з регламентованими фізики-хімічними властивостями. На основі параметрів гострої токсичності даний ксенобіотик відноситься до помірно токсичних сполук. Середньолетальна доза (ДЛ50) для білих щурів і мишей була на рівні, відповідно 1,83 і 2,13г/кг маси тварин. Відповідно до програми дослідження в підгострому експерименті застосовувалися 1/10, 1/100 й 1/1000 ДЛ50, які вводили білим щурам пероральним шляхом за допомогою металевого зонда щоранку протягом 60 діб. Контрольна група тварин отримувала відповідні об’єми питної води. У кожній групі нараховувалося по 10 щурів масою 180–190 г. Експерименти виконувалися при дотриманні вимог «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986). Стан детоксикаційної функції печінки вивчали після тривалої токсифікації тварин на 60 добу експерименту по активності гідроксилюючої монооксигеназної системи  мікросом гепатоцитів [3–5]. Дослідженню підлягали дві мікросомальні електронно-транспортні системи: НАДФ·Н, що пов’язана з цитохромом Р450в якості термінального ланцюга, і НАД·Н, яка пов’язана з цитохромом b5в якості акцептора електронів [3, 4]. Оцінювалися при цьому такі параметри мікросомального окислення, як дихальна активність мікросом, вміст цитохромів Р450і b5, активність редуктаз. Стан системи мікросомального окислення найбільш повно й об’єктивно може бути оцінений по швидкості метаболізму ксенобіотиків, що віддзеркалює активність як початкових (НАДФ·Н- і НАД·Н- редуктази), так і термінальних (цитохроми Р450 іb5) ділянок [5–7]. В якості субстрату мікросомальної Р450-залежної системи використовували р-нітроанізол (ксенобіотик), який підлягає окислювальному деметилюванню з утворенням р-нітрофенолу, що має властивий спектр поглинання в лужному середовищі [5–7]. Стан мікросомального окислення оцінювався по активності ферменту о-деметилази, НАДФ·Н-цитохром с-редуктази, НАД·Н-цитохром с-редуктази, швидкості ендогенного дихання мікросом, швидкості окислення НАДФ·Н, швидкості окислення НАДФ·Н у присутності ЕДТА, швидкості перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) і вмісту цитохромів Р450і b5 [4–7]. Для статистичної оцінки групових розбіжностей використовували критерій Стьюдента-Фішера.

**Результати дослідження та їх обговорення**

Результати дослідження впливу субтоксичних доз Л-502-2-10 показали, що ксенобіотик в 1/10 й 1/100 ДЛ50 активує ферменти гідроксилюючої монооксигеназної системи мікросом гепатоцитів (табл. 1). Так, було відмічено підвищення активності о-деметилази , на 168,18% й 69,40%, НАДФ·Н-цитохром с-редуктази на 82,30% й 60,61%, а також НАД·Н-цитохром с-редуктази на 86,12% й 16,45%, відповідно під впливом 1/10 й 1/100 ДЛ50. Як свідчать отримані дані, Л-502-2-10 суттєво активує систему метаболізуючих ферментів. У таких умовах, це супроводжується прискоренням інактивації токсичних продуктів. Поряд з тим, мікросомальні ферменти здатні перетворювати вихідні субстрати в більш токсичні й біологічно активні сполуки. До небажаних проявів відносяться алергічні реакції, некроз тканин, канцерогенна й мутагенна дія й ін. В 1/1000 ДЛ50 ксенобіотик не впливав на о-деметилазну й цитохром с-редуктазну активність.

Таблиця 1

**Вплив субтоксичних доз Л-502-2-10 на ферментативну активність мікросомальної гідроксилюючої системи гепатоцитів**

|  |  |
| --- | --- |
|  Показники  | Група спостереження, M±m (ДЛ50) |
| Контроль( n=10) | 1/10(n=10) | 1/100(n=10) | 1/1000(n=10) |
| О-деметилаза, нмоль р-нітрофенолу / хв мг білка |  6,57±0,63 |  17,62±1,44\* |  11,13±0,94\* |  6,93±0,74 |
| НАДФ·Н-цитохром с-редуктаза, нмоль ци-тохрому с /хв·мг білка |  178,5±14,8 |  325,42±15,86\* |  286,7±11,50\* |  188,6±10,3 |
| НАД·Н-цитохром с-редуктаза, нмоль ци-тохрому с /хв·мг білка |  845,6±27,4 |  1573,85±66,38\* |  984,76±25,63\* |  830,42±31,16 |

Примітка: \* – різниця вірогідна p<0,05

Аналіз виявив, що поліоксипропіленгліколь в 1/10 та 1/100 ДЛ50 підвищує окислення чужорідних сполук ферментативною системою, до якої входить і цитохром Р450. При цьому, рівень цитохрому Р450підвищувався на 95,85% й 81,29%, а цитохрому b5– на 88,52% й 38,68%, відповідно в умовах токсифікації 1/10 й 1/100 ДЛ50 (табл. 2).

Експериментальні й клінічні дослідження показали важливу роль цитохромів в індукції хімічними сполуками канцерогенезу, особливо раку легень, сечового міхура, печінки й ін. [1, 2]. Автори переконливо доводять і пов’язують, що хімічний канцерогенез тісно поєднаний з утворенням реактивних метаболітів у реакціях біотрансформації ксенобіотиків та ушкодженням ними критичних генів, до яких відносять гени, що беруть участь у регуляції клітинного росту – онкогени [3, 4]. Тому, баланс активності реакцій активації й детоксикації хімічних сполук, процесів репарації ДНК та елімінації

Таблиця 2

**Тривалий субтоксичний вплив Л-502-2-10 на вміст цитохромів**

|  |  |
| --- | --- |
|  Показники  | Група спостереження, M±m (ДЛ50) |
| Контроль( n=10) | 1/10(n=10) | 1/100(n=10) | 1/1000(n=10) |
| Цитохром в5,нмоль/мг білка |  0,61±0,07 |  1,15±0,09 |  0,846±0,06 |  0,62±0,08 |
| Цитохром Р450,нмоль/мг білка |  0,957±0,08 |  1,874±0,123 |  1,735±0,105 |  0,963±0,07 |

Примітка: \* – різниця вірогідна p<0,05

клітин з пошкодженим геномом, на їх думку, визначають вірогідність розвитку раку [1–3]. Відомо, що цитохром Р450– мембранозв’язаний інтегральний білок, йому властивий ряд унікальних функцій: окислення й трансформація різних по своїй хімічній струк-турі речовин як ендогенного, так і екзогенного походження – фармпрепаратів, пестицидів, детергентів, солей важких металів, поліциклічних ароматичних вуглеводів, ароматичних амінів, афлотоксинів [3, 4]. У процесі деяких із цих реакцій утворюється значна кількість активних форм кисню – гідроперекисів, перекисів, вільних радикалів, які є промоторними агентами, здатними стимулю-вати проліферацію неопластичних клітин в органах-мішенях. Дослідження виявили, що Л-502-2-10 в 1/10 та 1/100 ДЛ50стимулює швидкість ендогенного дихання, швидкість окислення НАДФ·Н, швидкість окислення НАДФ·Н  у присутності ЕДТА на тлі значного підвищення процесів ПОЛ (табл. 3).

Так, швидкість ендогенного дихання зростала на 221,96% й 134,84%, швидкість окислення НАДФ·Н – на 204,37% й 156,87%, швидкість окислення НАДФ·Н у присутності ЕДТА – на 160,36% й 25,81%, швидкість ПОЛ – на 721,73% й 417,39, відповідно під впливом 1/10 й 1/100 ДЛ50. Ці дані вказують, що система мікросомального окислення, трансформуючі Л-502-2-10, призводить до накопичення реактивних кисневих метаболітів, які здатні пошкоджувати мембрани, клітинні макромолекули (білки, нуклеїнові кислоти й ін.), що є потенційно небезпечним для формування віддалених наслідків, у тому числі мутагенезу, канцерогенезу, атерогенезу, імунологічної недостатності й ін. Недіючою дозою в усіх випадках на детоксикаційну функцію печінки була 1/1000 ДЛ50.

**Таблиця 3**

**Вплив Л-502-2-10 на споживання мікросомами кисню в умовах тривалої субтоксичної дії**

|  |  |
| --- | --- |
|  Показники  | Група спостереження, M±m (ДЛ50) |
| Контроль( n=10) | 1/10(n=10) | 1/100(n=10) | 1/1000(n=10) |
| Швидкість ендогенного дихання,нмоль О2/ хв·мг білка |  1,32±0,08 |  4,25±0,38\* |  3,10±0,24\* |  1,40±0,12 |
| Швидкість окислення НАДФ·Н,нмоль О2/ хв·мг білка |  3,20±0,27 |  9,74±0,83\* |  8,22±0,75\* |  3,38±0,26 |
| Швидкість окислення НАДФ·Н у присутності ЕДТА, нмоль О2/ хв·мг білка |  2,75±0,31 |  7,16±0,65\* |  3,46±0,37\* |  2,84±0,29 |
| Швидкість ПОЛ,нмоль О2/ хв·мг білка |  0,46±0,09 |  3,78±0,35\* |  2,38±0,24\* |  0,53±0,08 |

Примітка: \* – різниця вірогідна p<0,05

**Висновки**

Таким чином, результат дослідження детоксикаційної функції печінки при тривалій дії субтоксичних доз Л-502-2-10 свідчать, що ксенобіотик в 1/10 й 1/100 ДЛ50 суттєво підвищує активність о-деметилази, НАДФ·Н-цитохром с-редуктази, НАФ·Н-цитохром с-редуктази, а також вміст цитохромів Р450і в5на тлі зростання ПОЛ, швидкості ендогенного дихання, окислення НАДФ·Н та окислення НАДФ·Н у присутності ЕДТА. ˮЛапролˮ Л-502-2-10 в 1/10 та 1/100 ДЛ50 активує мікросомальну монооксигеназну детоксикаційну систему, яка поєднана з накопиченням реактивних метаболітів біотрансформації – вільних радикалів, гідроперекисів, перекисів та активних форм кисню, що є потенційно небезпечним для формування можливих віддалених наслідків. В 1/1000 ДЛ50 ксенобіотик не впливає на детоксикаційну функцію печінки і є недіючою дозою при тривалій субтоксиній дії в умовах підгострого експерименту.

**Література:**

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

2. Детергенты – модуляторы эффектов / [В.И. Жуков, В.В. Мясоедов, Ю.И. Козин и др.]  – Белгород: «Белвитамины», 2000. – 374 с.

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

4. Цыганенко А.Я. Структурно- метаболические механизмы формирования нарушений клеточного и гуморального иммунитета под воздействием детергентов в связи с проблемой охраны водных экосистем / [А.Я. Цыганенко, В.И. Жуков, Н.Г. Щербань и др. ]. – Харьков.: 2001.  – 413 с.

5. Komoth S.A., Narayan K.A. Interactio of Cа2+with endoplasmatic reticulum of rat liveri a standardized procedure for the isolation of rat liver microsomass / S.A. Komoth, K.A. Narayan // Analyt. Biochem. – 1972 – Vol. 48, № 1. – Р. 53–61.

6. Ernster L. Enzymo-structure relation – shipe in endoplasmatic reticbm of rat liver. A morphological. And biochemical study / L. Ernster, Oh. Siekevitz, G.E. Palode // Molek. Biol. – 1962. – Vol. 15, № 3. – P. 541–562.

7. Omura T. The carbon monooxidebinding pigment of liwer microsome / T. Omura, R. Sato // I. Biol. Chem. – 1964. – Vol. 239, № 7. – Р. 2379–2385.