Сборник трудов ХХІІІ международной научно-практической конференции «Инновационные пути решеня актуальных проблем базовых отраслей, экологии, энерго- и ресурсосбережения» (г. Харьков, 1-5 июня 2015 г.). – Харьков. - 2015 г. – С. 81-85.

УДК: [616-008.9:577.1’311.477]-092.9-099:543395

**Щербань Н.Г., Жуков В.И., Николаева О.В., Кучерявченко М.А., Безродная А.И.**

**Воздействие лапроксида л-512 на энергетику метаболических процессов в митохондриях**

Харьковский национальный медицинский университет

 *Изучено влияние субтоксических доз Лапроксида Л-512 на метаболическое состояние митохондрий в условиях подострого опыта. Установлено, что Лапроксид Л-512 в малых субтоксических дозах в условиях длительного перорального поступления в организм способен резко снижать энергопродукцию, разобщать дыхание и окислительное фосфорилирование, которые сопряжены с развитием мембранной патологии.*

**Ключевые слова:** ксенобиотики, энергетический обмен, метаболизм, митохондрии, мембранная патология.

Проблема химического загрязнения окружающей среды и рационального использования природных ресурсов является наиболее актуальной проблемой в условиях кризисного состояния биосферы. Интенсивная разработка и внедрение в производство новых технологических схем, широкий ассортимент химической продукции, быстрое наращивание производственных мощностей, размещение основных предприятий в густонаселенных местах приводит к формированию неблагоприятных условий проживания человека, что сопряжено с возникновением различных заболеваний и экологически обусловленных патологических состояний [1].

Многие заболевания, предпатологические и патологические процессы в организме проявляются нарушением физико-химических и структурно-метаболических свойств биологических мембран. Это отчетливо проявляется при аллергических реакциях, иммунологической недостаточности, сахарном диабете, псориатической патологии, ионизирующем воздействии на организм, атеросклерозе, гипертонической болезни и др. Среди причин, изменения структуры и функций мембран, важное место занимает токсическое влияние различных химических соединений, которые индуцируют свободнорадикальные процессы и перекисное окисление липидов (ПОЛ). По мнению ряда авторов, многие ксенобиотики способны осуществлять модификацию клеточных белков, разрушать мембранные структуры за счет активации свободнорадикальных процессов и ПОЛ [2,3,4,5]. При этом, особенно подчеркивается важная роль цитоплазматических мембран, как активных регуляторов внутриклеточного механизма. Исследования показывают, что изменение структурных компонентов мембран под воздействием чужеродных химических факторов, могут служить сигналом о необходимости функциональной перестройки клетки и внутриклеточных структурно-функциональных единиц (митохондрий, эндоплазматической сети, лизосом, аппарата Гольджи, ядра, пероксисом и др.). Высокой чувствительностью к воздействию химических соединений обладают митохондриальные мембраны и их структурно-функциональные компоненты – белки, фосфолипиды, ферменты. В связи с тесным единством структуры, функций и метаболизма, поиск критериально-значимых показателей донозологической диагностики при формировании патологических процессов, необходимо осуществлять, прежде всего, изучая особенности структурно-метаболических нарушений функционирования клеточных мембран.

 Учитывая вышесказанное, целью данной работы являлось изучение влияния малых субтоксических доз лапроксидов на метаболическое состояние митохондрий и процессы биоэнергетики в условиях подострого токсикологического эксперимента.

Объектом исследования была выбрана новая группа химических веществ, имеющая товарное название “Лапроксиды” с регламентированными физико-химическими свойствами. К этим веществам относится олигоэфирмоноэпоксид молекулярной массы 512 (Л-512).

Программа исследования предусматривала проведение длительного подострого токсикологического опыта на половозрелых белых крысах популяции Вистар массой 190-200г. В соответствии с условиями опыта, животным на протяжении 1,5 месяцев ежедневно утром натощак с помощью металлического зонда перорально вводились водные растворы Лапроксидов в дозах 1/10, 1/100 и 1/1000 ДЛ50. Контрольная группа получала соответствующие объемы питьевой воды.

По завершении подострого эксперимента изучалось метаболическое состояние митохондрий. Для оценки дыхания митохондрий и окислительного фосфорилирования, полярографически определяли скорость потребления кислорода в присутствии акцептора - (V3). В этом метаболическом состоянии митохондрий содержится избыток субстрата окисления и АДФ, что сопряжено с наибольшей интенсивностью их дыхания. На следующем этапе исследовалось потребление кислорода митохондриями после добавления сукцината - (V4), а также после исчерпания добавляемого АДФ в присутствии разобщителя – 2,4-динитрофенола (2,4-ДНФ) – метаболическое состояние (V4'), которое характеризуется дефицитом только АДФ. Это метаболическое состояние называют контролируемым, и оно характеризуется низкой интенсивностью дыхания. При этом рассчитывали: отношение АДФ/О2, дыхательный коэффициент (ДК) Ларди и активность АТФ-гидролазных реакций. В качестве субстрата окисления использовали сукцинат [6].

Определение Ca2+-, Mg2+-зависимой АТФ-азы в гепатоцитах осуществлялось общепринятым методом [7].

 Полученные результаты обрабатывались методом вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента-Фишера.

Результаты изучения влияния субтоксических доз лапроксида Л-512 на метаболические состояния митохондрий обнаружили, что ксенобиотик в 1/10 и 1/100 ДЛ50 значительно снижает дыхание митохондрий после добавления субстрата окисления – сукцината (V4), дыхание после добавления АДФ (V3) и дыхание митохондрий после добавления разобщителя окисления и фосфорилирования – 2,4-ДНФ (V41) по сравнению с контрольной группой наблюдения (табл. 1.). Во всех случаях токсификации Л-512 доза 1/1000 ДЛ50 не оказывала воздействие на структурно-функциональное состояние митохондрий в условиях длительного перорального поступления в организм. Исследования обнаружили существенное снижение коэффициента фосфорилирования, что может быть связано с разобщением дыхания и фосфорилирования, которое сопряжено также с ингибированием поглощения неорганического фосфата для синтеза АТФ. Результаты выявили также значительное снижение потребление кислорода митохондриями гепатоцитов под влиянием исследуемого ксенобиотика, что подтверждалось уменьшением ДК Ларди, который отражает отношение скорости поглощения кислорода в метаболическом сотоянии ,,V3” к скорости поглощения кислорода в состоянии ,,V4” до ввода в ячейку АДФ.

 Полученные данные свидетельствуют, что Лапроксиды снижают долю фосфорилирующего окисления в митохондриях гепатоцитов и увеличивают долю свободного дыхания. На это указывает снижение интенсивности дыхания в безакцепторной среде и в третьем метаболическом состоянии V3 после добавления АДФ, соответственно на 53,69% и 44,61% под влиянием 1/10 и 1/100 ДЛ50 Лапроксидов Л-512. Установленное снижение дыхания и фосфорилирования АДФ в митохондриях может быть обусловлено ингибированием активности мембраноструктурированного фермента сукцинатдегидрогеназы, что сопровождается разобщением дыхания и фосфорилирования (табл. 1).

*Таблица 1.*

**Влияние субтоксических доз лапроксида Л-512 на метаболическое состояние митохондрий в подостром опыте**

|  |  |
| --- | --- |
| Показатели, ткани | Группа наблюдения (ДЛ50), М±m |
| Контроль(n=10) | 1/10(n=10) | 1/100(n=10) | 1/1000(n=10) |
| Дыхание митохондрий после добавления сукцината (V4), (нмоль О2/мин•мг белка), гепатоциты | 1,82±0,16 | 0,95±0,08\* | 1,26±0,17\* | 1,71±0,19 |
| Дыхание после добавления АДФ (V3), (нмоль О2/мин•мг белка), гепатоциты | 6,3±0,54 | 2,54±0,32\* | 3,49±0,28\* | 6,15±0,66 |
| Дыхание после добавления разобщителя 2,4-ДНФ (V4'), (нмоль О2/мин•мг белка) | 7,46±0,63 | 3,40±0,34\* | 4,35±0,48\* | 7,24±0,58 |
| Дыхательный коэффициент Ларди (ДК=V3/V4, отн.ед), гепатоциты | 3,46±0,35 | 2,67±0,20\* | 2,77±0,22\* | 3,59±0,41 |
| Коэффициент фосфорилирования (АДФ/О2) | 2,64±0,27 | 1,20±0,09\* | 1,75±0,14\* | 2,58±0,32 |
| Mg2+- АТФ-аза (мкмоль Р/мг белка•1 час), митохондрии гепатоцитов | 81,46±4,70 | 45,3±3,44\* | 56,23±4,52 | 79,6±4,82 |
| Ca2+- АТФ-аза (мкмоль Р/мг белка•1 час), митохондрии гепатоцитов | 73,52±5,10 | 38,93±3,56\* | 48,6±3,74 | 71,96±5,43 |
| Н+- АТФ-аза (мкмоль Р/мг белка•1 час), митохондрии гепатоцитов | 74,60±4,35 | 44,7±3,68\* | 62,3±5,82\* | 72,36±6,40 |

Примечание: \* различия достоверные р ≤ 0,05

 Приведенные выше данные о нарушении функционального состояния митохондрий коррелируют с результатами исследования активности Ca2+-, Mg2+-зависимых АТФ-аз и Н+-АТФ-азы. Из таблицы видно, что ингибирование Н+-АТФ-азы митохондрий, также как и ингибирование дыхания, фосфорилирования и скорости АТФ-гидролазных реакций, зависит от дозы токсического влияния лапроксидов на гепатоциты. Снижение активности Н+-АТФ-азы, наблюдаемое при токсификации животных Лапроксидом, подтверждает данные о разобщении окисления и фосфорилирования и, следовательно, ингибировании энергопродукции в этих условиях. Одной из причин разобщения окисления и фосфорилирования в митохондриях пораженных гепатоцитов может быть усиление накопления в них ионов кальция. Некоторыми авторами было показано, что в условиях гипоксии скорость накопления кальция митохондриями увеличивается а высвобождение их происходит значительно медленнее, чем в условиях аэробиоза. При ишемии наблюдается снижение скорости Ca2+-зависимого выделения Н+ и окислительного фосфорилирования. Исследование накопления Ca2+ митохондриями и скорости синтеза АТФ в этих структурах показало, что синтез АТФ тормозится эндогенными ионами кальция [8].

 Следует полагать, что лапроксиды оказывая ингибирующее влияние на активность Ca2+-, Mg2+-зависимой АТФ-азы обеспечивают накопление Ca2+  в митохондриях и снижают их фосфорилирующую способность, которая сопряжена с разобщением дыхания и фосфорилирования. Увеличение скорости накопления кальция в митохондриях может быть сопряжено с повреждающим действием на их мембраны продуктов перекисного окисления липидов, образование которых существенно увеличивается под влиянием исследуемых ксенобиотиков [1,2,3,4,5]. Известно, что накопление кальция митохондриями является энергозависимым активным процессом, протекающим против градиента концентрации ионов. Поскольку накопление кальция митохондриями идет за счет энергии транспорта электронов в дыхательной цепи, то в этом случае, возможно, вся энергия дыхания будет тратиться главным образом на транспорт кальция, а не на фосфорилирование АДФ, то есть разобщается дыхание и фосфорилирование [6,7,8]. Вторым, важным фактором влияющим на процессы образования макроэргических соединений в митохондриях при токсификации гепатоцитов, может быть накопление свободных жирных кислот, которые, как известно, в больших количествах вызывают разобщение окисления и фосфорилирования. Источником образования значительного количества свободных жирных кислот могут быть процессы, которые связаны с нарушением структурно-метаболической организации мембранных структур, в том числе и митохондрий [9].

 **Вывод.**

Таким образом, результаты исследований показали, что Лапроксид Л-512 в малых субтоксических дозах 1/10 и 1/100 ДЛ50 в условиях длительного перорального поступления в организм способен резко снижать энергопродукцию, разобщать дыхание и окислительное фосфорилирование, которые сопряжены с развитием мембранной патологии. Вещество в 1/1000 ДЛ50 не оказывают влияние на энергетику метаболических процессов в митохондриях.

**Литература**

1. Научные основы обоснования прогноза потенциальной опасности детергентов в связи с регламентацией в воде водоемов / [Цыганенко А.Я., Жуков В.И., Щербань Н.Г., Евдокимов В.И.]. - Белгород.: Белвитамины., 2001. – 422 с.
2. Медико-биологические аспекты проблемы охраны водных объектов от загрязнения поверхностно-активными веществами / [Жуков В.И., Кратенко Р.И., Резуненко Ю.К., Зайцева О.В. и др.]. – Харьков.: Торнадо., 2000. – 394 с.
3. Биологическая активность детергентов – производных нонилбензолов в связи с проблемой охраны водных объектов / [Жуков В.И., Стеценко С.А., Пивень В.И., Мясоедов В.В. и др.]. - Белгород.: Белвитамины., 2000. – 237 с.
4. Эколого-гигиеническая характеристика азотсодержащих поверхностно-активных веществ как загрязнителей водоемов / [Жуков В.И., Мясоедов В.В., Стеценко С.А., Козин Ю.И. и др.]. - Харьков.: Торнадо., 2000. – 180 с.
5. Эколого-гигиеническая характеристика детергентов на основе алкилфенолов, изононилфенолов и вторичных спиртовых фракций С10-20 как загрязнителей водоемов / [Цыганенко А.Я., Шаповал Л.Г, Зовский В.Н., Щербань Н.Г.]. – Белгород.: Белвитамины., 2000. – 170 с.
6. Chance B. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation J. kinetics of oxyden utilization / B. Chance, G.R. Williams // J. Biol. Chem., 1955. – Vol. 217, № 1. – P. 383-395.
7. Мешкова Н.П. Практикум по биохимии / Н.П. Мешкова, С.Е. Северин. – М.: МГУ, 1979. – 428 с.
8. Биохимия миокарда, поврежденного адреналином / [Денисов В.М., Рукавишникова С.М., Жуков В.И.]. – Харьков.: РИП „Оригинал”, 1999. – 184 с.
9. 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.