1. **Вплив Лапроксиду марки Л-303 на структурно-метаболічний стан мембран в умовах підгострої інтоксикації / Щербань М.Г., Жуков В.І., Ніколаєва О.В., Кучерявченко М.О., Литвиненко О.Ю. // Експериментальна і клінічна медцина. – 2016 № 2 (71). – С. 232-236.**

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

Харківский 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 1/10, 1/100 і 1/1000 ДЛ50. Встановлено, що лапроксид Л-303 у 1/100 ДЛ50 активує окислювально-відновлювальні процеси у гепатоцитах, які супроводжуються генерацією активних форм кисню у мітохондріальному дихальному електрино-транспортному ланцюгу переносу електронів і протонів, що може супроводжуватися підвищенням вільнорадикальних процесів і перекисного окислення ліпідів. У значно більшій дозі, 1/10 ДЛ50 лапроксид пригнічував біоенергетичні, синтетичні процеси і знешкодження чужорідних хімічних сполук. 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. В 1/1000 ДЛ50 лапроксид Л-303 не впливає на структурно-функціональний стан плазматичних, мітохондріальних і мікросомальних 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 невиправдані 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 епоксидвмістних 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 дуже різноманітне по асортименту випускаючої на їх основі продукції. З кожним роком з’являються нові марки поліефірів з регламентованими фізико-хімічними властивостями. Це надлегкі термо-, кислото- і лугостійкі поліуретани, пластмаси, епоксидні смоли, лаки, емалі та ін. По масштабам застосування і об’єму світового виробництва прості поліефіри займають друге місце після детергентів [1, 2, 3, 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. Враховуючі вищенаведене, метою роботи було вивчення впливу лапроксиду марки Л-303 в 1/10, 1/100 і 1/1000 ДЛ50 на метаболічний стан клітинних мембран в умовах підгострої субтоксичної дії на організм теплокровних тварин.

**Матеріали і методи дослідження.**

 Вибір лапроксиду марки Л-303 було обґрунтовано великими обсягами виробництва, широким контактом з населенням і відсутністю прогностичної оцінки потенційної безпечності для теплокровних тварин. Даний простий поліефір представляє собою тригліцидиловий ефір поліоксипропілентріолу (Л-303), молекулярної маси 300. По агрегатному стану, це в’язка, прозора рідина добре розчинна в ефірі, спиртах, толуолі, бензолі. У воді утворює стійку емульсію. На основі параметрів 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 масою 190-200 г популяції Вістар, тривалістю 45 діб. Тварини щоденно вранці натщесерце пероральним шляхом за допомогою металевого зонду отримували водні розчини лапроксиду із розрахунку 1/10, 1/100 і 1/1000 ДЛ50. Контрольна група тварин отримувала відповідні об’єми питної води. У 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 та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Відповідно до мети і завдань дослідження в плазматичних мембранах гепатоцитів вивчалася активність ферментів 5'-нуклеотидази, Na+-, К+-АТФази, лужної фосфатази (ЛФ); в мітохондріальних мембранах визначалася активність моноамінооксидази (МАО), сукцинатдегідрогенази (СДГ) і цитохромоксидази (ЦХО); в мікросомальних мембранах ендоплазматичного ретикулуму визначалася активність глюкозо-6-фосфатази (Г-6-Фази), НАД•Н-дегідрогенази, Са2+-АТФази і Mg2+-АТФази [5, 6, 7, 8].

5'-нуклеотидаза здійснює гідроліз АМФ з утворенням неорганічного фосфату (Нф), який визначали колориметричним методом при довжині хвилі 680 нм по Фіске-Суббароу. Na+-, К+-АТФазна активність визначалася як різниця значення активності в середовищі з оуобаіном і без нього. Для виявлення Нф здійснювали фарбування середовища в синій колір по Фіске-Суббароу. Активність лужної фосфатази (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 використовувався спектрофотометричний метод і реакція окислення N-диметилпарафенілдіаміну. СДГ зв'язана з внутрішньою мембраною мітохондрій і представляє собою флавопротеїд визначення якого проводилось пектрофотометричним методом. Глюкозо-6-фосфатаза мікросомальної фракції ендоплазматичного ретикулуму гідролізує Г-6-фосфат на глюкозу і Нф. Принцип методу визначення активності даного ферменту заснований на кількості вивільненого у результаті гідролізу Г-6-фосфата неорганічного фосфату. Активність НАД•Н-дегідрогенази визначали спектрофотометричним методом по зміні оптичної щільності при λ = 340 нм, характерній для відновленого НАД•Н [5, 6].

Са2+-, Mg2+- залежні АТФази здійснюють гідроліз АТФ при активному транспорті іонів Са2+ і Mg2+ в саркоплазматичному ретикулумі. В основі методу лежить визначення Нф, який вивільняється при гідролізі АТФ ферментом. Нф з молібденовою кислотою утворює комплексне сполучення, яке легко відновлюється у синій колір. Спектрофотометрування здійснювали при λ = 680нм проти проби, що не вміщувала білка [5, 6].

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

Статистичне опрацювання отриманих результатів здійснювалося з використанням критерію Стьюдента-Фішера.

**Результати дослідження.**

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

Так, доза 1/100 ДЛ50 підвищувала активність 5'-нуклеотидази, Na+-, К+-АТФази і ЛФ, відповідно на 24,76%, 22,60% і 30,56%. Проте токсифікація тварин 1/10 ДЛ50 приводила до зниження активності 5'-нуклеотидази, Na+-, К+-АТФази і ЛФ, відповідно на 53,73%, 55,81% і 42,80%. Ці дані свідчать, що лапроксид Л-303 в 1/100 ДЛ50 активує метаболічні процеси в плазматичних мембранах гепатоцитів, які можуть бути поєднані з підвищенням транспортної і рецепторної функції. За таких умов слід очікувати, що ксенобіотик в 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%, цитохромоксидази на 11,15% і сукцинатдегідрогенази на 33,76%. Ці дані свідчать, що лапроксид Л-303 у 1/100 ДЛ50 значно прискорює процеси дезамінування біогенних моноамінів (серотоніну, гістаміну, адреналіну, норадреналіну та ін.), окислення сукцинату до фумарату, транспорт електронів та окислювальне фосфорилювання в дихальному ланцюзі.

Таблиця

**Вплив лапроксиду Л-303 на структурно-метаболічний стан гепатоцитів в умовах підгострої токсифікації щурів на 45 добу експерименту**

|  |  |
| --- | --- |
| Показники | Група, ДЛ50 M±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±10,8 |
| Na+-, К+-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 n-нітрофенола / мг білка•1 хв) | 74,6±5,3 | 43,2±3,8\* | 97,4±5,6\* | 79,5±6,2 |
| Моноамінооксидаза (нмоль NH3 / 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 сукцината / 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 |
| НАД•Н-дегідрогеназа (мкмоль НАД•Н / мг білка•1 год) | 22,5±3,1 | 10,9±1,2\* | 33,6±2,5\* | 23,7±2,4 |
| Са2+-АТФаза (нмоль Рн / мг білка•1 хв) | 152,6±11,7 | 174,8±7,5\* | 183,7±9,3\* | 150,3±12,2 |
| Mg2+-АТФаза (нмоль Рн / мг білка•1 хв) | 148,3±13,5 | 83,6±5,4\* | 178,6±8,5\* | 146,7±9,13 |

Примітка: \* різниця вірогідна (р<0,05) з контролем.

Аналіз оціночних показників мембран мікросом ендоплазматичного ретикулуму гепатоцитів виявив підвищення активності глюкозо-6-фосфатази на 30,69%, НАД•Н-дегідрогенази на 49,33%, Са2+-, Mg2+-залежної АТФази, відповідно, на 20,38% та 20,43% у тварин токсифікованих 1/100 ДЛ50. Результати показують, що у цій дозі лапроксид активує синтетичні процесиі 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 гепатоцитів на 63,35%, НАД•Н-дегідрогенази на 51,56%, Са2+-, Mg2+-АТФази, відповідно, на 50,99% і 45,22%, що свідчило про зниження анаболічної і детоксикаційної функції печінки.

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

**Обговорення результатів дослідження.**

Дослідження впливу 1/10 ДЛ50 при тривалій субтоксичній дії 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 вказує, що дисфункція плазматичних мембран тісно поєднана з формуванням багаточисельних порушень обміну речовин і енергії, в тому числі, розвитку можливих віддалених наслідків токсичної дії ксенобіотиків [1, 2, 3, 4].

Аналіз показує, що 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-пристосувальних механізмів, які спрямовані на забезпечення гомеостатичної функції організму. В 1/10 ДЛ50 лапроксид Л-303 пригнічував активність мітохондріальних мембран по закінченню підгострої токсифікації, що знайшло віддзеркалення у зниження активності МАО, ЦХО та мембранозв’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-пристосувальних механізмів і адаптації в умовах тривалої субтоксичної дії ксенобіотика.

**Висновки:**

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

2. У значно більшій дозі, 1/10 ДЛ50 лапроксид пригнічував біоенергетичні, синтетичні процеси і знешкодження чужорідних хімічних сполук.

3. В 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. Щербань Н.Г., Жуков В.И., Мясоедов В.В., Резуненко Ю.К. Биохимические аспекты экологической патологии, связанной с химическим загрязнением поверхностных источников водоснабжения. Харьков: Раритеты Украины, 2011. – 176 с.
2. Щербань Н.Г., Жуков В.И., Мясоедов В.В. Оценка рисков здоровья населения опасных отходов (биохимические аспекты). Харьков: Апостроф, 2010. – 156 с.
3. Щербань Н.Г., Жуков В.И., Мясоедов В.В., Капустник В.А. Биохимические механизмы радиомиметических эффектов поверхностно-активных веществ. Харьков: Раритеты Украины, 2012. – 120 с.
4. Щербань М.Г., М’ясоєдов В.В., Капустник В.А. та ін. Регіональна система організації оздоровлення населення на рекреаційних водоймах. Харків: ХНМУ,2014. – 212 с.
5. Рибальченко В.К., Коганов М.М. Структура й функції мембран. – Київ: Вища школа, 1988. – 312 с.
6. Современные методы в биохимии (под ред. академика 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

Харьковский национальный медицинский университет

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-303в 1/10, 1/100 і 1/1000 ДЛ50.Установлено, что лапроксид Л-303 у 1/100 ДЛ50 активирует окислительно-востановительные 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, что лежит в основе структурных клеточных нарушений. В 1/1000 ДЛ50 лапроксид Л-303 не влияет на структурно-функциональное состояние плазматических, митохондриальных и микросомальных мембран.

Ключевые слова: ксенобиотики, клеточные мембраны, гепатоциты.

N.G. Scherban, V.I. Zhukov, O.V. Nikolaeva, М.А. Kucheriavchenko,

E.U. Litvinenko

Kharkov National Medical University

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 і 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.

**Keywords**: xenobiotics, cell membranes, hepatocytes.