

УДК 616.314-089.28(615.465+615.464)-07:6.31.092

А.Ю. Никонов, доцент, канд. мед. наук,
О.В. Зайцева, профессор, д-р биол. наук,
О.И. Антюфеева, ст. препод., канд. биол. наук,
О.П. Мещерякова, доцент, канд. физ.-мат. наук,
Л.М. Рисованая, ассистент

*Харьковский национальный медицинский университет
пр. Ленина, 4, г. Харьков, Украина, 61022.*

E-mail: liya_m@inbox.ru

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ МИТОХОНДРИЙ ГЕПАТОЦИТОВ БЕЛЫХ КРЫС ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ КОБАЛЬТО-ХРОМОВЫХ СПЛАВОВ МЕТАЛЛОВ

В оценке резервных возможностей, а также степени устойчивости организма к модифицированному действию используемых в стоматологической практике кобальто-хромовых сплавов, наиболее адекватными являются исследования на уровне микросомальной оксигеназной системы с параллельным изучением активности мембраноструктурированных ферментов [1]. Биотрансформация любых ксенобиотиков в организме связана с работой печени, лёгких, кожи, почек, селезенки, надпочечников, клеток иммунокомпетентной системы и других органов и тканей.

Основной структурно-функциональной единицей, осуществляющей детоксикацию химических соединений, выступает эндоплазматическая сеть гепатоцитов, а именно ферментная система микросомальной мембраны [2]. Особый интерес при этом представляют исследования метаболических процессов в митохондриях, т.к. важнейшим звеном в обеспечении функционирования восстановительных синтезов являются биоэнергетические процессы и связанные с ними поглощение неорганического фосфата и потребление кислорода, которые сопровождаются генерацией макроэргических субстратов в дыхательной электронно-транспортной цепи митохондрий [3].

Оценка состояния микросомального окисления, процессов дыхания и фосфорилирования является актуальной при изучении механизма биологического действия ксенобиотиков.

В связи с вышесказанным, целью работы явилось изучение влияния кобальто-хромового сплава (КХС) марки «Виталиум» на систему микросомального окисления и процессы сопряжения дыхания и фосфорилирования.

Экспериментальная часть исследований выполнена на белых крысах линии Вистар с исходной массой 0,18-0,21 кг ($N_1=30$), которым ежедневно скармливали с пищей 0,01 г порошка КХС в виде водной взвеси. Контрольную группу составили $N_2=24$ крысы.

Продолжительность подострого воздействия препарата на теплокровных составляла 1,5 месяца. После окончания эксперимента животные подвергались декапитации под легким эфирным наркозом с последующим выделением печени, которая перфузировалась охлажденным раствором Krebs-Рингера. Затем 1 г охлажденной ткани измельчали и гомогенизировали в 4 мл среды, содержащей 0,3 М сахарозы, 1 мМ 7 ДТА, 10 мМ трис-НС1 буфер, рН = 7,4.

При изучении биоэнергетических процессов в митохондриях гепатоцитов белых крыс под воздействием водной взвеси КХС в реакционную среду, содержащую 200 мМ маннитола, 50 мМ сахарозы, 10 мМ KH_2PO_4 , 30 мМ трис-НС1 (рН=7,4), вносили сукцинат (8мМ) и АДФ (250 мкмоль). По кривым потребления кислорода определяли скорость дыхания в метаболических состояниях 3 (V_3), 4 (V_4), а также V_{4p} в присутствии разобшителя 2,4-динитрофенола (ДНФ, 50 мкмоль). Скорость дыхания выражали в нмоль $\text{O}_2/\text{мин}$ на 1 мг белка [3]. Рассчитывали отношение $\text{АДФ}/\text{O}_2$, аналогичное по своему значению с коэффициентом фосфорилирования P/O_2 и характеризующее сопряженность процессов окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи. Далее определяли дыхательный коэффициент (ДК) как отношение скорости поглощения кислорода в состоянии V_3 к скорости поглощения в состоянии V_4 (до ввода АДФ), а также активность АТФ-гидролазных реакций как отношение V_3/V_{4p} , характеризующее скорость регенерации АДФ после его фосфорилирования. В качестве субстрата окисления использовали сукцинат.

Измерение активности Ca^{2+} - и Mg^{2+} -зависимой АТФ-азы проводилось общепринятыми методами. АТФ-азная активность рассчитывалась в мкмольх фосфата/1 мг белка за 1 ч.

Таблица
Метаболическое состояние митохондрий гепатоцитов белых крыс под воздействием водной взвеси КХС

Показатели	Контроль n=24	Опыт n=30
Дыхание после добавления сукцината (V_4) (нмоль $\text{O}_2 \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка)	1,82±0,03	1,41±0,07*
Дыхание после добавления АДФ (V_3) (нмоль $\text{O}_2 \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка)	6,42±0,40	4,71±0,25*
Дыхание после добавления разобшителя 2,4-ДНФ (V_{4p}) (нмоль $\text{O}_2 \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка)	7,31±0,43	5,10±0,18*
Дыхательный коэффициент $\text{ДК}=V_3/V_4$	3,53±0,26	3,09±0,16
Коэффициент фосфорилирования – $\text{АДФ}/\text{O}_2$	2,65±0,20	1,31±0,06*
Mg^{2+} -активируемая АТФ-аза (мкмоль $\text{P}/\text{мг}$ белка · 1 ч)	80,46±1,60	58,24±2,30*
Ca^{2+} -активируемая АТФ-аза (мкмоль $\text{P}/\text{мг}$ белка · 1 ч)	65,32±2,20	51,61±2,10*
H^+ -АТФ-синтетаза (мкмоль $\text{P}/\text{мг}$ белка · 1 ч)	75,50±3,14	43,38±2,58*

Примечание: * – различия с контролем достоверные, $p < 0,05$.

Как видно из результатов, представленных в таблице, скорость окисления сукцината сукцинатдегидрогеназой в метаболическом состоянии митохондрий V4 в опытной группе животных снижалась по сравнению с контрольной на 22,5%. Учитывая тесную связь фермента сукцинатдегидрогеназы с внутренней мембраной митохондрий, можно предполагать, что имеет место нарушение структурно-функционального состояния мембраны, связанное с изменением ее физико-химических свойств: мембранной проницаемости, вязкости, заряда, гидрофобного объема, полярности и др.

Добавление акцептора токсифицированным крысам в состоянии V₃ и дополнительно разобщителя 2,4-ДНФ в состоянии V_{др} вызывало уменьшение скорости дыхания соответственно на 26,6% и 20,5%, что, очевидно, связано со снижением величины мембранного потенциала. При этом не выявлено статистически достоверных изменений в значениях дыхательного коэффициента в контрольной группе (ДК = 3,53±0,26) по сравнению с опытной группой, в которой ДК достигал значения 3,09±0,16.

Значение коэффициента фосфорилирования (АДФ/О₂) также существенно уменьшалось в опытной группе животных (на 50,5%) по сравнению с контрольной, что позволило судить о разобщении дыхания и фосфорилирования.

Полученные данные о нарушении метаболического состояния митохондрий гепатоцитов коррелировали с активностью их АТФ-аз: наблюдалось заметное уменьшение в опытной группе содержания как Mg²⁺-, Ca²⁺-активируемой АТФ-аз, так и H⁺-АТФ-синтетазы по сравнению с контролем соответственно на 27,6%; 20,9% и 42,5%. Поскольку активность АТФ-аз митохондрий связывают с процессами окисления и фосфорилирования, эти результаты представляют значительный интерес для понимания структурно-метаболических механизмов патогенеза интоксикации организма экспериментальных животных водной взвесью КХС.

Выводы. Кобальто-хромовый сплав, широко используемый в ортопедической стоматологии, может оказывать ингибирующее влияние на процессы биоэнергетики, приводить к разобщению тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования, формируя при этом патологические реакции, в основе которых лежат свободнорадикальная патология, энергетический голод и тканевая гипоксия клеток.

Библиографический список

1. Зайцева О.В. Микросомальное окисление как критерий оценки токсического действия химических соединений // О.В. Зайцева. Сб. научн. тр. Медицинская экология. Гигиена производства и окружающей среды. Харьков: ХГМУ, 1999. – С. 179-182.
2. Никонов А.Ю. Нарушение прооксидантно-антиоксидантного гомеостаза при введении никеля и нитрида титана / А.Ю. Никонов // Проблеми медичної науки та освіти. – 2005. – №2. – С. 49-52.
3. Петренко А.Ю. Выделение гепатоцитов крыс неферментативным методом: детоксикационная и дыхательная активность / А.Ю. Петренко, А.Н. Сукач, А.Д. Рослякова [и др.] // Биохимия. – 1991. – Т.56, №9. – С. 1647-1651.