

- ❖ *Молекулярні механізми розвитку патології*
- ❖ *Біохімія у діагностиці та лікуванні*
- ❖ *Біохімія серцево-судинних хвороб*
- ❖ *Біохімічна гепатологія та нефрологія*
- ❖ *Біохімія ендокринних хвороб*
- ❖ *Патохімія спадкових хвороб*
- ❖ *Патохімія екстремальних станів*
- ❖ *Біохімія в хірургічній клініці*
- ❖ *Нейрохімія та патохімія головного мозку*
- ❖ *Імунохімія*
- ❖ *Біохімія радіаційних уражень*
- ❖ *Біохімічні аспекти моделювання патологічних процесів*
- ❖ *Ксенобіохімія*
- ❖ *Методи біохімічних досліджень*
- ❖ *Історія біохімії*
- ❖ *Проблеми і досвід викладання біологічної та медичної хімії*
- ❖ *Інформація, хроніка, ювілеї*

- ❖ *Molecular Mechanisms of Pathology Development*
- ❖ *Biochemistry in Diagnostics and Treatment*
- ❖ *Biochemistry of Cardiovascular Diseases*
- ❖ *Biochemical Hepatology and Nephrology*
- ❖ *Biochemistry of Endocrinopathy*
- ❖ *Patochemistry of Hereditary Diseases*
- ❖ *Patochemistry Extremal States*
- ❖ *Biochemistry in Surgical Clinics*
- ❖ *Neurochemistry and Patochemistry of Cerebrum*
- ❖ *Immunochemistry*
- ❖ *Biochemistry of Radiation Injuries*
- ❖ *Biochemical Aspects of Simulation of Pathologic Processes*
- ❖ *Xenobiochemistry*
- ❖ *Methods of Biochemical Investigations*
- ❖ *History of Biochemistry*
- ❖ *Problems and Experience of Biological and Medical Chemistry Teaching*
- ❖ *Information, Chronicle, Jubilees*

МЕДИЧНА ХІМІЯ

Науковий журнал

Виходить з 1999 року

Свідоцтво про державну реєстрацію: серія KB № 3647

Передплатний індекс: 22869

Відповідно до постанови президії ВАК України від 09.06.1999 р. № 1-05/7 журнал "Медична хімія" внесений до переліку фахових видань, в яких можуть публікуватися результати дисертаційних робіт на здобуття наукових ступенів доктора і кандидата медичних, фармацевтичних і біологічних наук.

АДРЕСА РЕДАКЦІЇ:

Журнал "Медична хімія"
 Видавництво "Укрмедкнига"
 Майдан Волі, 1
 46001, м. Тернопіль
 УКРАЇНА

Тел.: (0352) 22-97-29
 (0352) 25-47-84

Fax: (0352) 22-41-83

E-mail: korda@tdma.ssft.ternopil.ua
<http://tdma.ssft.ternopil.ua/journals>

За зміст рекламних матеріалів відповідальність несе рекламодавець. При передруці або відтворенні повністю чи частково матеріалів журналу "Медична хімія" посилання на журнал обов'язкове.

© Науковий журнал "Медична хімія"

Зміст

ПЕРЕДОВА СТАТТЯ

Гоженко А.І., Ніколаєвська І.В., Котужинська С.Г., Бабій В.П. ОКСИД АЗОТУ ТА ІМУННА СИСТЕМА ОРГАНІЗМУ

5

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Соловійов А.І., Легенький В.В., Зеленський С.М., Стефанов О.В. ВПЛИВ НІТРОГЛІЦЕРИНУ НА СКОРОТЛИВУ АКТИВНІСТЬ ТА ВМІСТ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННОГО Ca^{2+} ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ ХВОСТОВОЇ АРТЕРІЇ ЩУРА ЗА РІЗНИХ УМОВ ПОПЕРЕДНЬОЇ АКТИВАЦІЇ

10

Кургальок Н.М., Іккерт О.В., Горинь О.В., Гордій С.К., Серебровська Т.В., Гальків М.О. ВПЛИВ ОКСИДУ АЗОТУ НА МЕХАНІЗМИ РЕГУЛЯЦІЇ ВМІСТУ АКТИВНИХ ФОРМ КИСНЮ В АДАПТИВНИХ ВІДПОВІДЯХ ОРГАНІЗМІВ З РІЗНОЮ РЕЗИСТЕНТНІСТЮ ДО ДІЇ ГІПОКСИЧНОГО ФАКТОРА

14

Костюшов В.В., Тимчишин О.Л., Морозкін В.В., Мардашко О.О., Костюшова Н.В. ФЕНОМЕН ВИВІЛЬНЕННЯ Ag^{+} -ЧУТЛИВИХ -SH ВМІСНИХ НЕБІЛ-КОВИХ З'ЄДНАНЬ ПРИ ВЗАЄМОДІЇ АЛАНІН-АМІНОТРАНСФЕРАЗИ Й АСПАРТАТ-АМІНОТРАНСФЕРАЗИ СИРОВАТОК КРОВІ ЗІ СУБСТРАТАМИ ТА ЙОГО ДІАГНОСТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ

19

Самохіна Л.М., Познахарева Т.О., Самохін А.О. АКТИВІШТЬ ХІМАЗИ, ТОНІНУ ТА ЕЛАСТАЗИ У ЩУРІВ ЗА УМОВ ОКСИДУВАЛЬНОГО СТРЕСУ, ЯКИЙ ВИКЛИКАНО ВВЕДЕННЯМ ХЛОРИДУ РТУТІ

25

Гонський Я.І., Кліщ І.М., Корда М.М. ОСОБЛИВОСТІ ВПЛИВУ КАРНІТИНУ ХЛОРИДУ НА ЕНЕРГЕТИЧНІ ПРОЦЕСИ У ПЕЧІНЦІ ТВАРИН РІЗНИХ ВІКОВИХ ГРУП ЗА УМОВИ ІНТОКСИКАЦІЇ СОЛЯНОКИСЛИМ ГІДРАЗИНОМ

29

Бухтіарова Т.А., Шатиркіна Т.В., Бобкова Л.С. КОМПЛЕКСИ АМІЗОНУ З ГІСТАМІНОМ І АПОЕНЗИМОМ ГІСТИДИНДЕКАРБОКСИЛАЗИ В МЕХАНІЗМІ ЙОГО ПРОТИЗАПАЛЬНОЇ ДІЇ

35

Олійник С.А. КОМПЛЕКСОУТВОРЕННЯ НОВОГО РОСЛИННОГО ПРЕПАРАТУ "ПОЛІФІТОЛ-1" З СОЛЯМИ МЕТАЛІВ ТА ДЕЯКИМИ ЛІКАРСЬКИМИ ЗАСОБАМИ

40

Ядловський О.Є. ФАРМАКОКІНЕТИКА ПІРОДАЗОЛУ ТА ПАРАЦЕТАМОЛУ ПРИ БОЛЬОВОМУ СИНДРОМІ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

45

Contents

EDITORIAL

Gozhenko A.I., Nikolayevskaya I.V., Kotuzhinskaya S.G., Babiy V.P. NITROUS OXIDE AND THE ORGANISMS IMMUNE SYSTEM

ORIGINAL INVESTIGATIONS

Solovyyov A.I., Legen'kyi V.V., Zelensky S.M., Stefanov O.V. NITROGLYCERINE EFFECT ON CONTRACTILE ACTIVITY AND INTRACELLULAR CALCIUM LEVEL OF RAT TAIL ARTERY VASCULAR SMOOTH MUSCLES UNDER THE DIFFERENT CONDITIONS OF PRE-ACTIVATION

Kurhalyuk N.M., Ikkert O.V., Horyn O.V., Hordii S.K., Serebrovskaya T.V., Galkiv M.O. THE INFLUENCE OF NITRIC OXIDE ON REGULATIVE MECHANISMS ACTIVE OXYGEN FORM CONTENT IN ADAPTIVE ANSWERS OF RATS WITH DIFFERENT RESISTANCE TO HYPOXIA

Kostiushov V.V., Tymchyshyn O.L., Morozkin V.V., Mardashko A.A., Kostyushova N.V. PHENOMENON OF Ag^{+} -SENSING -SH-CONTAINING NON-PROTEIN COMBINATIONS RELEASE CONNECTIONS AT INTERREACTION OF ALANINE AMINOTRANSFERASE AND ASPARTAT AMINOTRANSFERASE OF BLOOD SERA WITH SUBSTRATUMS AND ITS DIAGNOSTIC VALUE

Samokhina L.M., Poznakhareva I.A., Samokhin A.A. CHYMASE, TONIN AND ELASTASE IN RATS AT THE OXIDATIVE STRESS CAUSED BY INTRODUCTION OF MERCURY CHLORIDE

Honsky Ya.I., Klishch I.N., Korda M.M. FEATURES OF INFLUENCE OF A CARNITINE CHLORIDUM ON ENERGY PROCESSES IN A LIVER OF ANIMAL DIFFERENT AGE GROUPS AT AN INTOXICATION BY HYDRAZINE HYDROCHLORID

Bukhtiarova T.A., Shatyrkina T.V., Bobkova L.S. AMIZON COMPLEXES WITH HISTAMINE AND A HISTIDINE DECARBOXYLASE APOENZYME IN THEIR ANTI-INFLAMMATORY ACTION

Oliynyk S.A. COMPLEXMAKING OF NEW PLANT DRUG "POLYPHYTOLUM-1" WITH METAL SALTS AND SOME DRUGS

Yadlovsky O.E. PHARMACOKINETICS OF PIRODAZOL AND PARACETAMOL WITH EXPERIMENTAL PAIN SYNDROME

КОРОТКІ ПОВІДОМЛЕННЯ

Сольський Я., Негрич Т.І., Сеньків Н.Б.
ДІАГНОСТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ ВИЗНАЧЕННЯ
КОНЦЕНТРАЦІЇ БІЛКІВ ГОСТРОЇ ФАЗИ В
СИРОВАТЦІ КРОВІ ХВОРИХ НА РОЗСІЯНИЙ
СКЛЕРОЗ ІЗ ДЕБЮТОМ ЗАХВОРЮВАННЯ У
ВИГЛЯДІ РЕТРОБУЛЬБАРНОГО НЕВРИТУ

49

Зіменковський А.Б., Підковка Н.О., Воробець З.Д.
ВПЛИВ МІДОКАЛМУ НА АКТИВНІСТЬ
ГЛУТАТІОНОВОЇ АНТИПЕРОКСИДНОЇ
СИСТЕМИ В ЛІМФОЦИТАХ КРОВІ

52

Ковтун А.І., Мещишен І.Ф. ВПЛИВ ДАЛАРГІНУ
ТА ГІПЕРБАРООКСІЇ НА СТАН ГЛУТАТІОНО-
ВОЇ СИСТЕМИ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ ЗА УМОВ
ГОСТРОГО ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО
ПЕРИТОНІТУ

55

Зеляк М.В., Дзвонковська В.В. ДИНАМІКА
РІВНІВ НИРКОВИХ ЛІЗОСОМАЛЬНИХ
ГІДРОЛАЗ У ПРОЦЕСІ ЛІКУВАННЯ ХВОРИХ
З ОБСТРУКЦІЄЮ СЕЧОВОДІВ
КОНКРЕМЕНТАМИ

58

ОГЛЯДИ

*Пентюк О.О., Ільченко О.В., Шевчук С.В.,
Андрушко І.І., Данченко О.П.* ВИЗНАЧЕННЯ
КОНЦЕНТРАЦІЇ ГОМОЦИСТЕЇНУ В БІОЛО-
ГІЧНИХ РІДИНАХ МЕТОДОМ ВИСОКО-
ЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

61

МЕТОДИ БІОХІМІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

*Шаповалов В.В., Шаповалова В.О.,
Друшлякова Л.В., Губський Ю.І.* СУДОВА
ХІМІКО-ФАРМАЦЕВТИЧНА ОЦІНКА
ВИЗНАЧЕННЯ ДОМІШКИ КИСЛОТИ
САЛІЦИЛОВОЇ В СИЛЬНОДІЮЧОМУ
КАРДІОЛОГІЧНОМУ ЗАСОБІ

69

Дівоча В.А., Сова С.Ю., Михальчук В.М.
ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ТРИПСИНО-
ПОДІБНОЇ ПРОТЕАЗИ З ЛЕГЕНІВ БІЛИХ
МИШЕЙ

73

*Безуглий П.О., Георгіянц В.А., Перехода Л.О.,
Бевз Н.Ю., Таран А.В.* СИНТЕЗ НОВИХ
СИМЕТРИЧНИХ ДІАМІДІВ МАЛОНОВОЇ
КИСЛОТИ ЯК ПОТЕНЦІЙНИХ БІОЛОГІЧНО
АКТИВНИХ РЕЧОВИН

78

BRIEF REPORTS

Solski J., Negrych T.I., Senkiv N.B. THE
DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE OF ACUTE
PHASE PROTEINS
CONCENTRATION DETERMINATION IN
BLOOD PLASMA OF PATIENTS WITH
MULTIPLE SCLEROSIS WITH THE DISEASE
ONSET AS RETROBULBAR NEVRITIES

Zimenkovsky A.B., Podkovka N.O., Vorobets Z.D.
EFFECT OF MIDOKALM ON THE
GLUTATHIONE ANTIPEROXIDE SYSTEM OF
THE HUMAN LYMPHOCYTES

Kovtun A.I., Meshchysheh I.F. THE EFFECT OF
DALARGIN AND HYPERBARIC OXYGENATION
ON THE STATE OF THE GLUTATHIONE
SYSTEM OF THE RAT HEPATIC SYSTEM
UNDER CONDITIONS OF ACUTE
EXPERIMENTAL PERITONITIS

Zelyak N.V., Dzvonnkovska V.V. DYNAMICS OF
THE LEVELS OF RENAL LIZOSOME ENZYMES
DURING THE TREATMENT OF THE PATIENTS
WITH URETERAL OBSTRUCTION
BY A CONCREMENTS

REVIEWS

*Pentiu A.A., Il'chenko A.V., Shevchuk S.V.,
Andrushko I.I., Danchenko O.P.* DETERMINATION
OF HOMOCYSTEINE CONCENTRATION IN
BIOLOGICAL FLUIDS BY HIGH
PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

METHODS OF BIOCHEMICAL INVESTIGATIONS

*Shapovalov V.V., Shapovalova V.A.,
Drushlyakova L.V., Hubsy Yu.I.* FORENSIC
CHEMICO-PHARMACEUTICAL ESTIMATION
OF SALICYLIC ACID ADMIXTURE
DETERMINATION IN DRASTIC CARDIOLOGIC
REMEDY

Divocha V.A., Sova S.Yu., Mykhalchuk V.M.
ELIMINATION AND PURIFICATION OF
TRYPSIN-SIMILAR PROTEASE FROM THE
LUNGS OF WHITE RATS

*Bezugly P.A., Georgiyants V.A., Perekhoda L.A.,
Bevz N.Yu., Taran A.V.* SYNTHESIS OF NEW
SYMMETRIC DIAMIDES OF MALONIC ACID
AS POTENTIAL BIOLOGICALLY ACTIVE
AGENTS

ОКСИД АЗОТУ ТА ІМУННА СИСТЕМА ОРГАНІЗМУ

А.І. Гоженко, І.В. Ніколаєвська, С.Г. Котюжинська, В.П. Бабій
ОДЕСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

У статті розглянуто питання впливу оксиду азоту на імунну систему організму. Вперше представлено дані щодо антибактеріальних властивостей нейтрофілів з огляду на NO-продукцію. Виявлено прямий зв'язок між процесом утворення NO та процесами активації і фагоцитозу в нейтрофілах *in vitro*.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: оксид азоту, нейтрофіли, фагоцитоз, макрофаги.

Підвищений інтерес до біологічних властивостей та регуляторних можливостей оксиду азоту (NO) сформував новий підхід до вивчення морфо-функціональних особливостей "професійних фагоцитів" – поліморфноядерних нейтрофілів та клітин, які входять до складу системи мононуклеарних фагоцитів. Відкриття нових властивостей NO дало змогу по-новому подивитися на участь цих клітин у процесах неспецифічного протимікробного захисту та специфічної імунологічної перебудови організму, реакціях клітинного та протипухлинного імунітету.

Вивчення ендогенного синтезу NO в організмі почалося з відкриття продукції нітратів безпосередньо в тканинах організму [23]. Пізніше було встановлено, що найімовірнішим агентом синтезу нітратів є макрофаги [7]. До того ж, нарівні з нітратами утворюються нітри, приблизно в еквімолярних співвідношеннях. У подальшому стало відомо, що нітри є похідними NO, молекула якого швидко, за 3-5 с, перетворюється в ці сполуки.

NO є невеликим і структурно простим внутрішньоклітинним месенджером, який складається з азоту та кисню.

Ендогенний NO утворюється з L-аргініну за допомогою спеціального ферменту NO-синтази (NOS). Остання приєднує молекулярний кисень до кінцевого атома азоту в гуанідиновій групі L-аргініну [29, 35].

Ключовим етапом у синтезі нітратів та нітритів макрофагами є гідроксилювання аміногрупи з наступним окисненням NO. Реакція гідроксилювання прискорюється кофактором тетрагідробіоптерином та являє собою Ca^{2+} -

кальмодулінзалежну реакцію, яка блокується CO. На наступній стадії реакції стехіометрично утворюються L-цитрулін та NO у вільно-радикальній формі [16]. Утворення ще більш окиснених продуктів нітрифікації (NO_2^- та NO_3^-) пов'язане з побічними хімічними реакціями.

На сьогодні відкрито дві ізоформи NO-синтази: конститутивну (cNOS) та індукцибельну (iNOS). За локалізацією в тканинах прийнято виділяти нейрональну (nNOS), ендотеліальну (eNOS) та макрофагальну (macNOS).

cNOS – кальційзалежна, міститься в ендотеліальних клітинах судин, деяких нейронах, мозковому шарі надниркових залоз, нирках. Для її активації не потрібен синтез нового білка-ферменту [18]. Під впливом відповідних стимулів (ацетилхоліну, гістаміну, глутамату тощо) Ca^{2+} потрапляє до клітини, активує cNOS, що призводить до короткочасного виділення невеликої кількості NO [1, 6, 8].

iNOS експресується, як правило, у відповідь на активацію клітин цитокінами та генерує в 1000 разів більше NO, ніж cNOS. Головними індукторами цього ферменту є бактеріальні ліпополісахариди, різного роду ендотоксини, інтерлейкін-1 (IL-1), γ -інтерферон, фактор некрозу пухлин (TNF). Гальмувати утворення даного ферменту можуть глюкокортикоїди, інтерлейкін-4, тромбоцитарний та β -трансформуючий фактори росту [26, 29, 31, 36].

На відміну від cNOS, що виконує регуляторні функції, iNOS здійснює, головним чином, захист організму від бактерій, грибів, найпростіших, а також пухлинних клітин. Такий вагомий цитотоксичний ефект зумовлений здатністю NO втручатися в ряд найскладніших реакцій, які забезпечують нормальну імунну діяльність клітин, пригнічуючи активність гем-

складних ензимів та викликаючи наприкінці загибель як сторонніх клітин, що проникли в організм, так і патологічно змінених клітин власного організму [2, 6].

Деякі автори з фактом специфічного утворення NO в макрофагах пов'язують механізм протимікробної активності, особливо відносно тих мікроорганізмів, для яких характерним є внутрішньоклітинний паразитизм [4]. Після активації цитокінами, бактеріальними ендотоксинами та ліпополісахаридами макрофаги посилюють синтез NOS, яка сприяє вивільненню з L-аргініну NO. Виділяючись із макрофагів, NO інгібує цитохромні ферменти, ферменти циклу Кребса та синтезу ДНК. У цих умовах енергопродукування та поділ клітини не можливі й клітина гине [10].

Ряд авторів розглядає NO як імуносупресивну молекулу, яка переноситься з NO-генеруючих клітин (макрофагів) до сусідніх Т-клітин для регулювання проліферації лімфоцитів [25].

Вважають, що регуляторна активність NO пов'язана з його здатністю регулювати процеси на рівні активних центрів залізоскладних ферментів [4, 18].

Результати представлених на культурах клітин і тваринах досліджень вказують на наявність у макрофагах цитотоксичних систем: оксидативної й неоксидативної. До останньої належить система NO. Показано, що для NO в цитозолі макрофагів необхідний NADPH [28, 33]. Цей же кофермент потрібний для утворення радикалів кисню. Обидві цитотоксичні системи є конкурентами за оволодіння тим самим коферментом.

Метаболічні зміни, які відбуваються під впливом цитотоксичних макрофагів, характеризуються інгібуванням включення тимідину до молекули ДНК клітин-мішеней та інгібуванням аконітази в циклі Кребса. До складу аконітази входять залізотіолові простетичні групи, необхідні для її каталітичної активності [4, 27, 32]. З'єднуючись із ними, NO_2^- утворюють неактивні нітрозилзалізні комплекси. Використання реактивних метаболітів NO для утворення цих комплексів пояснює зменшення токсичності макрофагів після додавання солей заліза до їх культури [11, 15, 19].

Вивчення антимікробних властивостей NO в культурі макрофагів дозволило з'ясувати, що синтез NO та фагоцитоз здійснюють тільки активовані макрофаги. Існує два способи їх активації: за допомогою антигену Т-лімфоцитів та без його участі.

Так, під час взаємодії з антигеном макрофаг продукує цитокіни IL-1 та TNF. Останні

стимулюють природні кілери, які починають синтезувати γ -IFN. Одночасна присутність γ -IFN та TNF у макрофагах необхідна для стимуляції NOS у них [12].

Другий спосіб вважають постійно діючим у тварин із нормальним імунітетом, а також першим ступенем в антимікробних відповідях мікроорганізму на інфекцію [3]. Імунні механізми з включенням Т-лімфоцитів активуються пізніше.

Розглядаючи NO в системі мононуклеарних фагоцитів, слід зазначити, що синтез NO значно збільшується при введенні інтерлейкіну-2 у людини та мишей. Оскільки цей вільний радикал проявляє протипухлинну дію за рахунок інгібування клітинного дихання та синтезу ДНК у ракових клітинах, вважають, що логічно говорити про імуносупресорний ефект NO [37].

Крім безпосередньої участі в клітинному метаболізмі, NO може бути фізіологічним регулятором й опосередковано, через утворення міцних окиснювачів – пероксинітритів, які переходять у пероксинітрокислоту [28].

При активації макрофагів або нейтрофілів відбувається респіраторний вибух, внаслідок якого утворюються активні форми кисню. Паралельно з цим продукується велика кількість NO, оскільки ініційована форма синтезу NO не регулюється фізіологічною концентрацією Ca^{2+} . У результаті реакції NO з вільними перекисними радикалами й утворюється пероксинітрит. Розкладаючись до гідроксильного радикала та активованого NO_2^- , він руйнує всі біомолекули на своєму шляху [22]. Пероксинітрит, який утворюється з двох вільних радикалів, сам не є радикалом, однак його потенціальна енергія та вільний гідроксильний радикал, що виникає, здатні серйозно порушити хід багатьох фізіологічних процесів.

Останні дослідження в галузі молекулярної біології та генетики дозволили оцінити молекулярні механізми клітинної токсичності, яка викликана NO. Токсичність NO вивчали на клітинних лініях яєчників китайського хом'ячка та лімфоцитах людини, які були оброблені NO [24]. Результати свідчать про те, що пошкоджуюча дія NO має надзвичайно складний характер, клітини гинуть внаслідок впливу багатьох механізмів. Одним із найбільш ранніх проявів дії NO на клітини є інгібування синтезу ДНК, яке виникає через порушення в структурі ланок ДНК, що призводить до блокування нормальної життєдіяльності клітин.

Під час дослідження кластерів диференціювання в системі мононуклеарних фаго-

цитів було виявлено, що активованим моноцитами людей притаманна ДНК-азна активність. ДНК-фрагментуюча активність ферменту зростала в присутності донорів NO при наявності іонів Ca^{2+} . NO-залежна активність не інгібувалась при додаванні іонів Zn [34]. Таким чином, було зроблено припущення про регуляторну роль NO, який виділяють активовані моноцити.

Вивчення молекулярних основ NO-продукції дозволило глибше оцінити патогенез та патофізіологію багатьох захворювань. Так, у хворих на множинний склероз у моноцитах було виявлено iNOS у зрілих активованих макрофагах. У цих хворих переважають моноцити з найбільш високою експресією HLA-DR антигенів відносно здорових людей. Інкубація мононуклеарних лейкоцитів здорових людей з імунomodуючим пептидом призводила до стимуляції та дозрівання моноцитів, при цьому збільшувався вміст м-РНК, відповідальний за продукцію iNOS та самого ферменту [30]. В даному випадку було показано участь NO-продукції моноцитів людини в регуляції експресії HLA-DR на мембранах клітин. Отримані дані свідчать про роль моноцитарної NO-синтази в автоімунній відповіді, яка лежить в основі патогенезу множинного склерозу.

На думку багатьох авторів, ще одним мультифакторіальним захворюванням, у формуванні якого, серед інших чинників, бере участь і макрофагальний NO, є інсулінозалежний цукровий діабет [9, 20]. З'ясовано, що макрофаги містять специфічний рецептор до IL-1. Внаслідок цієї взаємодії інгібується синтез інсуліну, а в цитоплазмі клітини накопичуються активні форми кисню: O_2^- , H_2O_2 , NO^- . Останній з них розглядають як медіатор цитокинової дії IL-1. NO викликає пригнічення активності одного з ферментів циклу Кребса – аконітази та зниження енергетичної ємності клітин за рахунок зменшення вмісту АТФ. Крім цього, вільні радикали викликають руйнування ДНК. Усе це разом призводить до руйнування β -клітин. При цьому специфічність такого ефекту IL-1 стосовно останніх пояснюється тим, що тільки інсуліносекретуючі клітини містять фермент iNOS. Для посилення експресії цього ферменту в людини необхідна комбінована дія IL-1 і γ -IFN. Сам IL-1 викликає семикратне збільшення продукції NO, тоді як у присутності γ -IFN та TNF – десятикратне [21].

Вільні радикали, що утворилися під впливом IL-1, можуть взаємодіяти один з одним та "народжувати" нові, більш токсичні радикали, такі, як пероксинітрил (ONOO^-), що викликають денатурацію багатьох білків β -клітин. Таким

чином, було висловлено припущення, що першопричиною інсулінозалежного цукрового діабету є не автодепресія, а активація макрофагів, які постійно присутні в острівцях Лангерганса (приблизно 10-15 на острівець), і застосування препаратів, що блокують функцію макрофагів, будуть достатньою мірою попереджувати розвиток діабету [9].

Дані останніх років свідчать про те, що ендогенний NO є важливим фактором неспецифічної резистентності макроорганізмів при внутрішньоклітинних інфекціях. Одним із доказів тому є досліди, в яких пригнічення синтезу NO в клітинах макроорганізму стимулювало розмноження збудників і загострення перебігу експериментальних інфекцій [12, 24]. Дефіцит NO всередині фагоцитуючих клітин – одна з головних причин незавершеності фагоцитозу й розмноження мікробів усередині фагоцитів.

Проведені нами дослідження антибактеріальних властивостей нейтрофілів, з огляду на NO-продукцію, дозволили з'ясувати, що в нейтрофілах *in vitro* процеси активації та фагоцитозу прямо пов'язані з процесом утворення NO. Так, нейтрофіли і в нормальному, і в активованому стані здатні продукувати NO, який фіксується у вигляді NO_2^- та NO_3^- , тоді як макрофаги виділяють NO тільки при активації. До того ж, фагоцити виділяють NO_2^- та NO_3^- інтенсивніше, ніж неактивовані нейтрофіли. Вихід нітратів у тому та іншому випадку, як правило, перевищує рівень нітритів, а інтенсивність виділення нітратів одним нейтрофілом перевищує рівень утворення нітритів [4]. Також було виявлено, що при незавершеному фагоцитозі відмічалась негативна динаміка утворення нітритів та позитивна – нітратів [13].

Досліди фагоцитарної активності нейтрофілів з використанням донатора NOS – нітрогліцерину та інгібітора – N^w -нітро-L-аргініну дозволили з'ясувати залежність фагоцитарної активності від вихідного рівня фагоцитозу. Так, при первісно достатній фагоцитарній активності (завершений фагоцитоз) нітрогліцерин різко підвищував утворення NO і збільшував фагоцитарне число, однак не впливав на перетравлювальну активність фагоцитів. Додавання нітрогліцерину при первісно порушеному фагоцитозі не тільки стимулювало виділення NO, але й сприяло відновленню перетравлювальної здатності фагоцитів. Фагоцитоз ставав завершеним [13].

Обробка нейтрофілів інгібітором NOS помірно пригнічувала утворення NO з прискоренням окиснення до нітратів та їх фагоцитарну активність незалежно від вихідного стану

фагоцитарної ланки. Крім того, інгібітор у середньому на 30 % знижував продукцію NO нейтрофілами, стимульовану нітрогліцерином. Останній блокує при цьому його вплив на фагоцитоз [13, 14].

Отже, синтез NO нейтрофілами позитивно корелює із фагоцитозом і частково зумовлений активністю конститутивної NO-синтази.

Таким чином, аналіз останніх даних літератури про унікальну роль NO в регуляції ряду життєво важливих процесів, зокрема в забезпеченні неспецифічної резистентності організму, дозволяє здійснити нові підходи до проблеми імунорекції на рівні NO-продукції та дає змогу ширше подивитися на молекулярні механізми патогенезу низки захворювань.

ЛІТЕРАТУРА

- Болдырев Ф.Ф. Универсальная и комплексная энзимология синтазы оксида азота // *Астрохимия*. – 1995. – **12**, № 1. – С. 3-13.
- Брюне Б., Сандау К., Кнетен А. Апоптотическая гибель клеток и оксид азота: механизмы активации и антагонистические сигнальные пути // *Биохимия*. – 1998. – **63**, № 7. – С. 966-975.
- Виноградов Н.А. Антимикробные свойства окиси азота в регуляции биосинтеза в макроорганизмах // *Антибиот. и химиотер.* – 1998. – **43**, № 2. – С. 24.
- Гоженко А.И., Доренский В.С., Рудина Е.И. и др. Причины и механизмы интоксикации нитритами // *Мед. труда и промышл. экол.* – 1996. – № 4. – С. 15-21.
- Гоженко А.И., Николаевская И.В., Федорук А.С. и др. Образование нитритов и нитратов нейтрофилами человека в процессе фагоцитоза // *Вісн. морської мед.* – 1998. – № 4. – С. 91-92.
- Ильницкий А.П., Реутов В.П., Рыжова Н.И. и др. Модифицирующее действие нитратов на легочный бластомогенез и вирусный лейкогенез у мышей: возможная роль окиси и двуокиси азота // *Физиол. человека*. – 2000. – **26**, № 3. – С. 11-15.
- Кубрина Л.Н., Якубович Я.М., Ванин А.Ф. L-аргинин – эндогенный источник оксида азота в тканях животных *in vivo* // *Изв. АН СССР. Серия: Биология*. – 1988. – № 6. – С. 844-849.
- Лалоянц И. Молекула газа // *Со всего света: Сеть Интернет*. – 1998. – № 84. – С. 23.
- Мальшев В.А. Инсулин-зависимый сахарный диабет как аутоиммунное заболевание: иммунодиагностика, иммунопрофилактика // *Имунол. та алергол.* – 1998. – № 1-2. – С. 53-54.
- Мальшев И.Ю. Введение в биохимию оксида азота. Роль оксида азота в регуляции основных систем организма // *Росс. журн. гатсроэнтерол., гепатол. и колопроктол.* – 1997. – **7**, № 1. – С. 49-55.
- Марков Х.М. О биорегуляторной системе L-аргинин-окись азота // *Патол. физиол. и эксперим. тер.* – 1996. – № 1. – С. 34-39.
- Миронов П.И., Альес В.Ф. Молекулярные аспекты системного воспалительного ответа при сепсисе // *Анестезиол.* – 2000. – № 4. – С. 1-9.
- Ніколаєвська І.В., Бабій В.П., Гоженко А.І. NO-залежні особливості фагоцитозу // *Фізіол. журн.* – 2000. – **46**, № 2. – С. 61.
- Ніколаєвська І.В. Визначення фагоцитарної активності нейтрофілів за допомогою оцінки NO-синтазної активності // *Тез. допов. наук. конф.* – Одеса, 1999. – С. 139.
- Пиганова Н.Л. Эндотелины и их роль в акушерской патологии // *Акуш. и гинекол.* – 1995. – № 2. – С. 9-10.
- Раевский К.С. Оксид азота – новый физиологический мессенджер: возможная роль при патологии центральной нервной системы // *Бюл. эксперим. биол. и мед.* – 1997. – № 5. – С. 123-127.
- Реутов В.П. Цикл окиси азота в организме млекопитающих // *Усп. биол. хим.* – 1995. – **35**. – С. 189-228.
- Сорокин Д.Ю. Нитрификация в тканях млекопитающих // *Усп. соврем. биол.* – 1991. – **3**, № 2. – С. 203.
- Супряга О.М. Роль эндотелиальной дисфункции в гипертензивных состояниях у беременных // *Акуш. и гинекол.* – 1995. – № 6. – С. 5-8.
- Чеботарев В.Ф. Современные представления о механизмах аутоиммунного процесса. Аутоагрессия и проблема иммунореабилитации при эндокринной патологии // *Имунол. та алергол.* – 1998. – № 1-2. – С. 55-56.
- Bach J.F. Insulin-Dependent Diabetes Mellitus as an Autoimmune Disease // *Endocrine Rev.* – 1994. – **15**, № 4. – P. 516-542.
- Beckman J.S., Beckman T.W., Chen J. et al. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implication for endothelial injury from nitric oxide and superoxide // *Prac. Natl.* – 1990. – **87**. – P. 1620.
- Bredt D.S., Snyder S.H. The expression of nitric oxide synthases in human brain tumours and peritumoral areas // *Annu. Rev. Biochem.* – 1994. – **63**. – P. 175-195.
- Burney S., Tamir S., Gol A., Tannenbaum S.R. A mechanistic analysis of Nitric Oxide – induced cellular toxicity // *Nitric Oxide*. – 1997. – **1**, № 2. – P. 130-144.
- Drapier J.C. L-arginine – derived nitric oxide and the cell mediated immunoresponse // *Res. Immunet.* – 1991. – **142**, № 7 – P. 553-555.
- Forsterman U., Flanke R.P. Nitric oxide as mediator of inflammation? // *Lab. Invest.* – 1998. – **59**. – P. 673-682.
- Gryglewski R.J., Palmer R.M.J., Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of

- endothelium derives vascular relaxing factor // Nature. – 1986. – **320**. – P. 454-459.
28. Kubes P. Nitric Oxide: a modulator of cell-cell interactions in the microcirculation. – Mol. Biology Intel. Unit., 1996. – 173 p.
29. Leions A.M., Palmeer R.M.J., Knowles R.G. et al. Molecular mechanisms of inhibition of nitric oxide synthase expression in interleukin // J. Biol. Chem. – 1991. – **226**. – P. 23790-23795.
30. Lyper-Maratalla N., Gontlez B., Aymerich M.S. et al. Monocyte inducible Nitric Oxide in multiple Sclerosis: regulator roll of Nitric Oxide // Nitric Oxide. – 1997. – **1**, № 1. – P. 95-104.
31. Marsden P.A., Broox T.A., Ballermaun B.I. The L-arginine – nitric oxide pathway // Amer. J. Rhyiol. – 1990. – **258**. – P. 1295-1303.
32. Moncada S. The first Robert Furchgott lecture: from endothelium-dependent relaxation to the L-arginine: NO pathway // J. Lab. Clin. Med. – 1992. – **120**. – P. 187-191.
33. Moncada S., Higgs A. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor // New English J. Med. – 1993. – **329**. – P. 2002-2012.
34. Pho R., Lyper-Zabalza M.J., Rouzaut A. et al. Nitric Oxide activates granule-associated DN-ase in human Menocytcs // Nitric Oxide. – 1998. – **2**, № 3. – P. 165-173.
35. Star R.A. Nitric oxide synthases: roles, tolls and controls // Amer. J. Med. Scien. – 1993. – **306**. – P. 348-358.
36. Tashizuni M., lorella N.S. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes // Circulat. Res. – 1993. – **73**. – P. 205-209.
37. Wolfram E.Samlowski, Chang-Yed Jim, John R.Mc.Gregor. Nitric Oxide Exposure Inhibits Inductonc of Lymphoehine // Nitric Oxide. – 1998. – **2**, № 1. – P. 45-56.

ОКСИД АЗОТА И ИММУННАЯ СИСТЕМА ОРГАНИЗМА

А.И. Гоженко, И.В. Николаевская, С.Г. Котюжинская, В.П. Бабий
ОДЕССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

Резюме

В статье рассмотрены вопросы влияния оксида азота на иммунную систему организма. Впервые представлены данные, касающиеся антибактериальных свойств нейтрофилов с точки зрения NO-продукции. Выявлена прямая связь между процессом образования NO и процессами активации и фагоцитоза в нейтрофилах in vitro.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **оксид азота, нейтрофилы, фагоцитоз, макрофаги.**

NITROUS OXIDE AND THE ORGANISM'S IMMUNE SYSTEM

A.I. Gozhenko, I.V. Nikolayevska, S.G. Kotuzhinska, V.P. Babiy
ODESSA STATE MEDICAL UNIVERSITY

Summary

The article investigates the influence of nitrous oxide on the organisms immune system. There are firstly presented the data concerning antibacterial properties of neutrophils in veiw of NO-production. The direct connection between process of NO formation and phagocytosis of neutrophils in vitro has been revealed.

KEY WORDS: **nitrous oxide, neutrophils, phagocytosis, macrophages.**

Отримано 6.04.2001 р.

Адреса для листування: А.І. Гоженко, кафедра загальної та клінічної патфізіології, Одеський державний медичний університет, пров. Валіховський, 2, Одеса, 65026, Україна.

ВПЛИВ НІТРОГЛІЦЕРИНУ НА СКОРОТЛИВУ АКТИВНІСТЬ ТА ВМІСТ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННОГО Ca^{2+} ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ ХВОСТОВОЇ АРТЕРІЇ ЩУРА ЗА РІЗНИХ УМОВ ПОПЕРЕДНЬОЇ АКТИВАЦІЇ

А.І. Соловйов, В.В. Легенький, С.М. Зеленський, О.В. Стефанов
ІНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГІЇ ТА ТОКСИКОЛОГІЇ АМН УКРАЇНИ, КИЇВ

У досліджах з одночасним визначенням скоротливої активності та вмісту внутрішньоклітинного Ca^{2+} гладеньких м'язів хвостової артерії щура було виявлено, що EK_{50} нітрогліцерину, де за ефект брали амплітуду розслаблення, залежала від умов попередньої активації, викликані, в одному випадку, розчином Кребса з високим вмістом K^+ , а в іншому – агоністом α_1 -адренорецепторів фенілефрином. EK_{50} у першому випадку майже на два порядки була меншою, ніж у другому. Одержані дані дозволяють зробити висновок, що різниця в значеннях EK_{50} для нітрогліцерину, отриманих за різних умов попередньої активації, може пояснити існування розбіжностей у застосуванні лікарських засобів у клініці при різних видах патології серцево-судинної системи.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: нітрогліцерин, внутрішньоклітинний кальцій, гладенькі м'язи судин.

ВСТУП. Органічні нітроестери, такі, як нітрогліцерин (НГ) та динітроіzosорбіт, відносяться до класу сполук, які використовують із метою лікування різноманітних хвороб серцево-судинної системи. Біологічна активність цих сполук ґрунтується на їх здатності зазнавати біотрансформації до оксиду азоту (NO), який, у свою чергу, розслаблює гладенькі м'язи судин (ГМС) [2, 6].

Незважаючи на багато досліджень, під час проведення яких було доведено утворення NO з нітроестерів у біологічному середовищі, хімічний механізм, за допомогою якого відбувається біотрансформація, залишається невизначеним. Існують дані про участь флавінів і тіолів у біотрансформації нітроестерів [12]. Із цих досліджень автори зробили висновок, що хімічний механізм біотрансформації органічних нітроестерів включає відновлення їх до органічного нітритного естеру, після чого відбувається перетворення на нітрозотіол. NO вивільняється з нітрозотіолів завдяки багатьом процесам, зокрема реакції з дигідрофлавінами та НАДН. Зараз уже відомо, що S-нітрозотіоли як стабілізована форма NO є судиноактивними метаболітами, утвореними внаслідок взаємодії НГ із ГМС [9], і що біотрансформація нітроестерів є ферментозалежною й тіолчутливою [5].

© А.І.Соловйов – д.м.н., В.В. Легенький, С.М. Зеленський – к.ф.-м.н., О.В. Стефанов – д.м.н., проф., 2001.

Використання селективних блокувальних фосфодіестерази, що руйнує циклічний гуанозин монофосфат (цГМФ) у ГМС, призводило до підсилення розслаблення, викликаного НГ, що дозволило припустити опосередкування цГМФ судинорозслаблювального впливу НГ, а отже активацію розчинної форми гуанілатциклази (рГЦ) [11]. Відомі також дані про цГМФ-незалежний механізм дії NO [4], зокрема НГ [7], що опосередковується калієвими каналами, які активуються Ca^{2+} .

Метою даної роботи було дослідження впливу НГ на скоротливу активність та вміст внутрішньоклітинного Ca^{2+} ГМС хвостової артерії щура при скороченні ГМС, в одному випадку, гіперкалієвим розчином Кребса (K^+ -Кребс), а в іншому – агоністом α_1 -адренорецепторів – фенілефрином (ФЕ). Імовірна розбіжність у кінетиці концентрація-ефект за цих умов і стала основою цієї роботи.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Об'єктом досліджень були сегменти хвостової артерії щурів-самців лінії Вістар масою тіла 200-250 г. Тварин умертвляли шляхом цервікальної дислокації, вирізали сегмент хвостової артерії довжиною 2-3 см й очищували від сполучної та жирової тканин. Цей сегмент розрізали на кільця довжиною 2-3 мм, які потім вивертали назовні. Усі процедури проводили при кімнатній

температурі в модифікованому розчині Кребса, що мав такий склад (мМ): NaCl – 122, KCl – 4,7, NaHCO₃ – 15,5, KH₂PO₄ – 1,2, CaCl₂ – 2,5, MgCl₂ – 1,2 та глюкоза – 11,5, рН – 7,3-7,4. Розчин Кребса з високим вмістом K⁺ (K⁺-Кребс, 70 мМ) готували за допомогою еквімолярного заміщення NaCl на KCl.

Досліди проводили в камері об'ємом 300 мкл, установленій на предметний стіл флуоресцентного мікроскопа ЛЮАМ-И2 (Санкт-Петербург, Росія). Кільця хвостової артерії щура підвішували ізометрично між нерухомим гачком і гачком, що приєднаний до датчика скорочень (AE 801, SensoNor A/S, Horten, Норвегія). Скорочувальну активність та D[Ca²⁺]_i кілець хвостової артерії щура реєстрували, використовуючи електронну інтеграцію активного натягу та флуоресцентного сигналу від фотоелектричного множника стосовно часу. За винятком процедури завантаження, кільця безперервно перфузували попередньо нагрітим розчином Кребса при температурі 35 °С та швидкості 2,0 мл за хвилину.

Вміст [Ca²⁺]_i визначали, використовуючи флуоресцентний кальцієвий індикатор Fura-2, ацетоксиметильний етер Fura-2, здатний проникати крізь клітинну мембрану (Fura-2 AM) [8]. Протягом 2 год при кімнатній температурі кільця хвостової артерії щура завантажували 10 мкМ Fura 2-AM у розчині з таким складом (мМ): NaCl – 122, KCl – 4,7, CaCl₂ – 2,5, MgCl₂ – 1,2, Pluronic F-127 – 5 мг/мл, HEPES (N-2 (гідроксіетилпіперазин-N'-2-етансульфонова кислота) – 11,6 та глюкоза – 11,5, рН – 7,3-7,4. Після завантаження кілець судин, перед тим як проводити дослідження, камеру перфузували вищезгаданим модифікованим розчином Кребса впродовж щонайменше 30 хвилин.

Результати вимірювань Δ[Ca²⁺]_i представлені як співвідношення флуоресцентних сигналів (F) при 340 та 380 нм, $R = F_{340\text{nm}}/F_{380\text{nm}}$. Абсолютні значення [Ca²⁺]_i залежать від константи дисоціації Fura-2 [8], його розповсюдження всередині клітини, зв'язування та компартменталізації [3]. Таким чином, метою наших досліджень було спостереження DF сигналу, що кількісно відображає D[Ca²⁺]_i, а отже, вважається придатним для досліджень процесів усередині клітин [1].

Усі неорганічні та органічні сполуки одержували від фірми Sigma Chemical Co. (США), нітрогліцерин – від Bio-Therabel (Бельгія), Fura-2 AM – від Molecular Probes, Inc. (США).

Статистичні підрахунки здійснювали з використанням програмного забезпечення Microcal Origin 4.00 (Microcal Software, Inc., США).

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Мета даної роботи полягала в детальному дослідженні впливу НГ на скоротливу активність і вміст внутрішньоклітинного Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i) гладеньких м'язів хвостової артерії щура. Об'єктом дослідження нами було вибрано хвостову артерію тварини, оскільки остання є судиною м'язового типу з розвинутим ендотелієм, тобто її ГМС гіпотетично чутливі до NO. Використовуючи діапазон концентрації НГ із п'яти значень, будуючи криві концентрація-ефект і вираховуючи EK₅₀, ми також ставили за мету вивчити вплив НГ залежно від його дози. Різні умови попередньої активації ГМС, викликані, в одному випадку, гіперкалієвим розчином Кребса (K⁺-Кребс), а в іншому – агоністом α₁-адренорецепторів фенілефрином (ФЕ), застосовували з метою вирізнити вплив НГ як непрямого донора NO на різні ланки кальцієвої сигналізації.

На рисунку 1 зображена крива концентрація-ефект для НГ за умов скорочення, ініційованого K⁺-Кребсом (вміст K⁺ – 70 мМ). Значення EK₅₀ вираховували, беручи за ефект скоротливу активність, тобто розслаблення ГМС у відповідь на НГ при різних концентраціях. EK₅₀ для НГ за умов скорочення K⁺-Кребсом становила 0,81×10⁻⁵ М.

На рисунку 2 зображено криву концентрація-ефект для НГ за умов скорочення агоністом α₁-адренорецепторів – ФЕ. EK₅₀ для НГ при скороченні, викликаному K⁺-Кребсом, складала 0,41×10⁻³ М.

Під час проведення досліджень ми використовували два типи скорочення, а саме, скорочення, викликане розчином Кребса з високим вмістом K⁺, і скорочення, спричинене розчином Кребса, що містив агоніст α₁-адренорецепторів – ФЕ. У першому випадку скорочення відбувається за рахунок безпосередньої деполяризації мембрани та, як наслідок, відкриття потенціал-залежних Ca²⁺-каналів, потрапляння Ca²⁺ всередину ГМС, що викликає скорочення судини. У другому випадку відбуваються взаємодія ФЕ з α₁-адренорецепторами на поверхні ГМС, активація фосфоліпази С і стимулювання рецепторів на поверхні саркоплазматичного ретикулула через фосфатидилінозитолфосфатний шлях, що призводить до вивільнення Ca²⁺ з його внутрішньоклітинного депо в цитоплазму клітини, що також спричиняє скорочення. Використання цих двох моделей скорочення дозволило нам дослідити вплив судиноактивної сполуки – НГ на його природну мішень – ГМС за різних умов, що можуть мати місце в організмі.

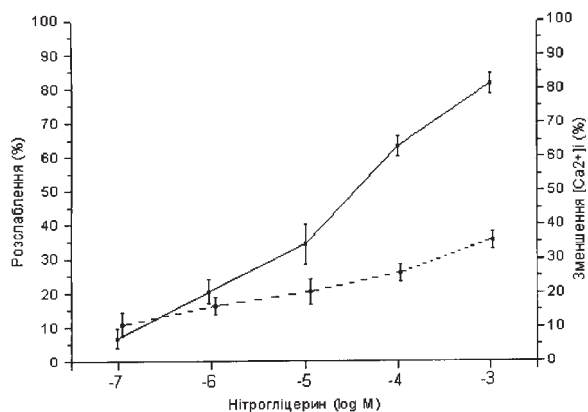


Рис. 1. Крива концентрація-ефект для НГ за умов скорочення ГМС К⁺-Кребсом. Скоротливу активність наведено як розслаблення судини, виражено у % від сили скорочення, викликаного К⁺-Кребсом, у момент додавання розчину з НГ. Зміну [Ca₂₊]_i виражено як зменшення його рівня у % від рівня [Ca₂₊]_i, що передувало додаванню розчину з НГ. Кількість дослідів (n) на кожну точку становить щонайменше 6.

Одержані дані дають можливість припустити існування розбіжностей, що можуть виникати в практичному застосуванні, тобто в клініці, коли за однієї дози різні пацієнти або один і той самий хворий у різних станах виявляють неоднакові реакції на препарат [10]. Дослідження молекулярних механізмів, що лежать в основі дії лікарських засобів, за різних умов, що можуть мати місце в організмі, дозволяють модулювати дію цих засобів з урахуванням особливостей фенотипу та/або стану пацієнта, підвищувати їх біодоступність і ефективність.

ЛІТЕРАТУРА

1. Baylor S.M., Hollingworth S. Measurement and interpretation of cytoplasmic [Ca²⁺]_i signals from calcium-indicator dyes // *News Physiol Sci.* – 2000. – **15**. – P. 19-25.
2. Berrazueta J., Lopez-Jaramillo P., Moncada S. Nitric oxide: from endogenous vasodilator to biologic mediator // *Rev. Esp. Cardiol.* – 1990. – **43**. – P. 421-431.
3. Blatter L.A., Wier W.G. Intracellular diffusion, binding and compartmentalization of the fluorescent calcium indicators indo-1 and fura-2 // *Biophys. J.* – 1990. – **58**. – P. 1491-1499.
4. Bolotina V.M., Najibi S., Palacino J.J. et al. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle // *Nature.* – 1994. – **368**. – P. 850-853.
5. Bron J., Sterk J., Timmerman H. Synthesis and pharmacology of a series of new organic nitrate esters // *Pharm. World Sci.* – 1995. – **17**. – P. 120-125.

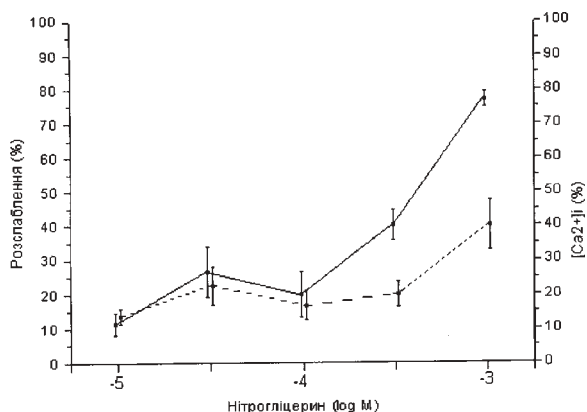


Рис. 2. Крива концентрація-ефект для НГ за умов скорочення ГМС агоністом α₁-адренорецепторів — ФЕ. Усі пояснення до кривої збігаються з поясненнями, наведеними для рисунку 1.

ВИСНОВКИ. 1. Значення ЕК₅₀ для НГ у дослідях із використанням гладеньких м'язів хвостової артерії щура залежить від умов попередньої активації цих судин, тобто від активації різних механізмів вивільнення активуючого Ca²⁺.

2. Суттєва різниця між значеннями ЕК₅₀ для НГ, одержаними за різних умов скорочення ГМС, може пояснити існування розбіжностей у застосуванні лікарських засобів у клініці при різних видах патології серцево-судинної системи.

6. Feelish M., Brands F., Kelm M. Human endothelial cells bioactivate organic nitrates to nitric oxide: implications for the reinforcement of endothelial defence mechanisms // *Eur. J. Clin. Invest.* – 1995. – **25**. – P. 737-745.
7. Fukami Y., Toki Y., Numaguchi Y. et al. Nitroglycerin-induced aortic relaxation mediated by calcium-activated potassium channel is markedly diminished in hypertensive rats // *Life Sci.* – 1998. – **63**. – P. 1047-1055.
8. Gryniewicz G., Poenie G.M., Tsien R.Y. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties // *J. Biol. Chem.* – 1985. – **260**. – P. 3440-3450.
9. Hussain A., Crispino N., McLaughlin B., Brien J. Glycerol trinitrate-induced vasodilation is inhibited by ultraviolet irradiation despite enhanced nitric oxide generation: evidence for formation of a nitric oxide conjugate //

J. Pharmacol. Exp. Ther. – 1999. – **289**. – P. 895-900.

10. Salas E., Amado J.A., Sanshez de Vega M.J. Impaired vascular smooth muscle nitric oxide-dependent relaxation in human coronary arteries from transplanted heart vasculopathy // Arch. Inst. Cardiol Mex. – 1997. – **67**. – P. 11-16.

11. Wallis R.M., Corbin J.D., Ellis P. Tissue distribution of phosphodiesterase families and the

effects of sildenafil on tissue cyclic nucleotides, platelet function, and the contractile responses of trabeculae carneae and aortic rings in vitro // Am. J. Cardiol. – 1999. – **83**. – P. 3-12.

12. Wong P., Fukoto J. Reaction of organic nitrate esters and S-nitrosothiols with reduced flavins: a possible mechanism of bioactivation // Drug Metab. Dispos. – 1999. – **27**. – P. 502-509.

ВЛИЯНИЕ НИТРОГЛИЦЕРИНА НА СОКРАТИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ И СОДЕРЖАНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО Ca^{2+} ГЛАДКИХ МЫШЦ ХВОСТОВОЙ АРТЕРИИ КРЫСЫ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ АКТИВАЦИИ

А.И. Соловьев, В.В. Легенький, С.Н. Зеленский, А.В. Стефанов
ИНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГИИ И ТОКСИКОЛОГИИ АМН УКРАИНЫ, КИЕВ

Резюме

В опытах с одновременным определением сократительной активности и содержания внутриклеточного Ca^{2+} гладких мышц хвостовой артерии крысы было обнаружено, что $ЭК_{50}$ нитроглицерина, где за эффект брали амплитуду расслабления, зависела от условий предварительной активации, вызванной, в одном случае, раствором Кребса с высоким содержанием K^+ , а в другом – агонистом α_1 -адренорецепторов – фенилефрином. $ЭК_{50}$ в первом случае почти на два порядка была меньшей, чем в другом. Полученные данные позволяют сделать вывод, что разница в значениях $ЭК_{50}$ для нитроглицерина, полученных при различных условиях предварительной активации, может объяснить существование различий в применении лекарственных средств в клинике при различных видах патологии сердечно-сосудистой системы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: нитроглицерин, внутриклеточный кальций, гладкие мышцы сосудов.

NITROGLYCERINE EFFECT ON CONTRACTILE ACTIVITY AND INTRACELLULAR CALCIUM LEVEL OF RAT TAIL ARTERY VASCULAR SMOOTH MUSCLES UNDER THE DIFFERENT CONDITIONS OF PRE-ACTIVATION

A.I. Solovyov, V.V. Legenky, S.M. Zelensky, O.V. Stefanov
INSTITUTE OF PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY OF ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES OF UKRAINE, KYIV

Summary

It was shown, using simultaneous measurement of contractile activity and intracellular calcium level of rat tail artery vascular smooth muscles, that nitroglycerine EC_{50} , where the amplitude of relaxation was taken for effect, depended on the type of pre-activation, on one hand, with a high- K^+ Krebs solution, and on the other α_1 -adrenergist – phenylephrine. EC_{50} in the first case was two orders lower, than in the other one. The obtained data allow to suggest that the difference in values of EC_{50} for nitroglycerine under the different types of precontraction may explain the existence of difference in clinical application of drugs under the various pathological conditions of cardiovascular system.

KEY WORDS: nitroglycerine, intracellular calcium, vascular smooth muscles.

Отримано 11.04.2001 р.

Адреса для листування: В.В. Легенький, Інститут фармакології та токсикології АМН України, вул. Ежена Потье, 14, Київ, 03057, Україна.

ВПЛИВ ОКСИДУ АЗОТУ НА МЕХАНІЗМИ РЕГУЛЯЦІЇ ВМІСТУ АКТИВНИХ ФОРМ КИСНЮ В АДАПТИВНИХ ВІДПОВІДЯХ ОРГАНІЗМІВ З РІЗНОЮ РЕЗИСТЕНТНІСТЮ ДО ДІЇ ГІПОКСИЧНОГО ФАКТОРА

Н.М. Кургалюк, О.В. Іккерт, О.В. Горинь,
С.К. Гордій, Т.В. Серебровська¹, М.О. Гальків
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. І.Я. ФРАНКА
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ НАН УКРАЇНИ¹

Досліджено зміни активності ферментів антиоксидного захисту (АОЗ) (супероксиддисмутази, каталази, глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази, церулоплазмину) і перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) у тканинах щурів з різною резистентністю до гіпоксії за умов внутрішньочеревного введення донора оксиду азоту L-аргініну і блокатора NO-синтази L-NNA. Встановлено, що регуляторні системи NO неоднозначно пов'язані з функціонуванням системи АОЗ та ПОЛ і залежать від резистентності до гіпоксії.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: антиоксидний захист, супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза, церулоплазмин, перекисне окиснення ліпідів, резистентність до гіпоксії, оксид азоту, L-аргінин, L-NNA.

ВСТУП. Перекиси і вільні радикали, як ініціатори окиснювальних реакцій і ланцюгових процесів перекисного окиснення компонентів живої клітини (ПОЛ), призводять до її ушкодження [15]. Протягом останніх десяти років велика увага зосереджена на ролі оксиду азоту, який вважається одним з перспективних засобів корекції різноманітних процесів в організмі за екстремальних ситуацій і стимулює репаративно-відновні процеси при дії шкідливих факторів довкілля. Серед них важливе значення мають донори оксиду азоту, які сприяють нормалізації різноманітних порушень енергетичного обміну клітини і гальмуванню вільнорадикальних процесів [7, 13, 14].

Відомо, що в популяції тварин постійно існують особини, які значно відрізняються одна від одної чутливістю до нестачі кисню. Особливості реакції організму на його дефіцит виявляються не тільки на організмовому, а й на органному і тканинному рівнях. Зокрема, різна резистентність до дії гіпоксії корелює з особливостями функцій енергозабезпечення, серед яких основна роль належить холінергічним механізмам регуляції, які в кінцевому підсумку і визначають формування індивідуальної чутливості тканин до дефіциту кисню [6].

© Н.М. Кургалюк – к.б.н., О.В. Іккерт, О.В. Горинь – к.б.н., С.К. Гордій – к.б.н., Т.В. Серебровська – д.б.н., М.О. Гальків – к.б.н., 2001.

Тому виникає питання про значення ферментативної та неферментативної антиоксидних систем (АОС) клітин, які знешкоджують активні форми кисню (АФК) у високо- (ВР) і низькорезистентних (НР) до гіпоксії тварин в умовах різного функціонування NO-ергічної системи, зокрема при введенні донора оксиду азоту L-аргініну і блокатора NO-синтази L-NNA. Це стало метою нашої роботи.

МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проводили на 36 щурах-самцях лінії Вістар масою 200-220 г, яких утримували на стандартній дієті. Згідно з методом В.А. Березовського (1975), тварин попередньо поділяли за їх резистентністю до гіпобаричної гіпоксії на НР і ВР. Величину реакції щурів на гостру гіпоксію оцінювали за часом їх перебування на "висоті" 12 000 м ("підйом" у барокамері) до появи другого агонального вдиху або судом. У ВР тварин він складав 7 хв і більше, у НР – до 2 хв.

ВР і НР щурам вводили внутрішньочеревно в кількості 1 мл:

фізіологічний розчин, L-аргінин (600 мг/кг, фірми "Sigma", США) та блокатор синтази оксиду азоту N^o-монометил L-аргінин-L-NNA (35 мг/кг, фірми "Sigma", США). Час дії кожного препарату складав 30 хв. Тварин декапітували під ефірним наркозом.

Досліджували активність супероксиддисмутази (СОД) [5], каталази (КАТ) [4], глутатіонредуктази [9], глутатіонпероксидази [8], концентрацію дієнових кон'югат [10], малонового діальдегіду (МДА) [2, 11] і церулоплазміну (ЦП) [3]. Результати досліджень обробляли статистично, використовуючи критерій Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. При дослідженні системи АОЗ і процесів ПОЛ у тварин, які відрізняються чутливістю до дії гіпоксичного фактора, в контролі було виявлено неоднакову активність ферментів і метаболітів, що свідчить про різну здатність до інактивації АФК при дії стресорних навантажень, які супроводжуються гіпоксичними процесами. Це характеризує резервні компенсаційні можливості організму при впливі несприятливих факторів довкілля, які краще виражені у ВР щурів (табл. 1 і 2).

Внутрішньочеревне введення L-аргініну обом групам тварин супроводжувалося зниженням активності СОД, однак відсоток зниження був неоднаковим: для ВР щурів він становив 76,28 % ($p < 0,05$), а НР – 90 % стосовно контрольних величин. Вплив блокатора синтази оксиду азоту (NOS) L-NNA за аналогічних умов призводив до протилежного ефекту стосовно активності СОД: вона зростала на 11,4 та 16,7 % відповідно. Дія донора оксиду азоту викликала зниження активності другого ферменту АОЗ – КАТ, яка у НР організмів за умов введення L-NNA зростала на 11,5 % щодо значень інтактних щурів.

Існують множинні взаємодії оксиду азоту з АФК-залежними сигнальними механізмами. Серед них основна роль належить оксиду азоту як потужному перехоплювачу супероксиду. При концентрації NO, яка відповідає рівню СОД у тканині, він може конкурувати із СОД. Згідно з даними авторів [1], на коронарній і легеневій артеріях бика 50 нМ NO може перехоплювати до половини концентрації супероксиду в досліді із хемілюмінісценцією люциногену. Перевищення наномолярного рівня NO функціонує як внутрішньоклітинна пастка супероксиду через зміну активованих АФК сигнальних механізмів на альтернативні, які активуються NO. Інгібування КАТ за цих умов є додатковим важливим механізмом дії NO, оскільки опосередковується через механізми релаксації під впливом циклічної ГМФ і перекису водню [15].

Дослідження активності інших ферментів АОЗ – глутатіонредуктази (ГР) і глутатіонпероксидази (ГП) засвідчило зростання активності даних показників. Однак відсоток значно залежав від резистентності до дії гіпоксичного фактора і був вищим у ВР тварин. Це вказує на важливу роль ферментів системи глутатіону у формуванні NO-залежних реакцій у процесі адаптації до дії шкідливих чинників довкілля.

Глутатіон – трипептид, утворений глутаміновою кислотою, цистеїном та гліцином і присутній майже у всіх клітинних системах ссавців як тіолова сполука. Як ефективний відновлювач, він відіграє важливу роль у процесах детоксикації. Відновлений глутатіон легко реагує практично з усіма органічними

Таблиця 1 – Вплив L-аргініну і блокатора синтази оксиду азоту L-NNA на активність ферментів антиоксидного захисту і процеси перекисного окиснення ліпідів у крові й тканинах щурів із високою резистентністю до гіпоксії (n=6)

Умови досліджу	Висококорезистентні до гіпоксії щури		
	Контроль	Вплив L-аргініну	Вплив L-NNA
Супероксиддисмутаза, од. акт/мг·хв	253,66±12,33	193,75±10,16*	214,21±16,11
Каталаза, мкМ/хв·л	191,66±8,24	151,64±11,37*	188,80±9,16
Глутатіонредуктаза, мкМ NADPH ₂ /хв·л	24,89±2,43	38,20±3,76*	22,52±2,78
Глутатіонпероксидаза, мкМ/хв·л	92,51±6,41	179,45±6,33*	123,85±9,11
Церулоплазмін, мг%	16,68±0,71	22,47±1,32*	8,92±0,21*
Малоновий діальдегід			
кров, нМ/л	1,81±0,02	1,72±0,01*	2,13±0,03*
печінка, нМ/г	1,42±0,12	1,14±0,03	3,39±0,10*
серце, нМ/г	2,19±0,07	1,97±0,12	2,73±0,10*
Дієнові кон'югати			
кров, ΔD ₂₃₃ /мл	28,11±1,32	31,57±2,14	35,76±1,73*
печінка, ΔD ₂₃₃ /г	37,27±2,46	29,10±1,23*	39,12±2,12
серце, ΔD ₂₃₃ /г	19,60±1,16	21,25±2,56	36,75±3,44*

Примітка. * – зміни достовірні порівняно з контролем ($P < 0,05$).

Таблиця 2 – Вплив L-аргініну і блокатора синтази оксиду азоту L-NNA на активність ферментів антиоксидного захисту і процеси перекисного окиснення ліпідів у крові й тканинах щурів із низькою резистентністю до гіпоксії (n=6)

Умови досліджу	Висококорезистентні до гіпоксії щури		
	Контроль	Вплив L-аргініну	Вплив L-NNA
Супероксиддисмутаза, од.акт/мг·хв	205,50±21,14*	185,21±10,73*	216,77±14,04*
Каталаза, мкМ/хв·л	156,57±14,01	143,85±12,33	174,80±10,79*
Глутатіонредуктаза, мкМ NADPH ₂ /хв·л	22,24±1,47	14,12±4,22*	27,23±1,41*
Глутатіонпероксидаза, мкМ/хв·л	79,48±7,84	98,25±3,47	140,64±4,86*
Церулоплазмін, мг%	17,52±0,67	20,48±1,33	21,50±1,16
Малоновий діальдегід			
кров, нМ/л	1,89±0,11	1,64±0,11	2,36±0,10*
печінка, нМ/г	1,77±0,40	1,42±0,09	2,01±0,06
серце, нМ/г	1,85±0,03	2,05±0,06*	2,41±0,01*
Дієнові кон'югати			
кров, ΔD ₂₃₃ /мл	19,84±0,10	34,55±2,44*	26,92±3,11*
печінка, ΔD ₂₃₃ /г	35,70±2,22	34,62±3,33	35,37±3,23
серце, ΔD ₂₃₃ /г	25,60±3,45	25,94±2,56	30,91 ±2,66

вільними радикалами, особливо з гідроксильним і карбонільним. Однак основним його призначенням є циклічне окиснення–відновлення глутатіону при функціонуванні ферментів ГР та ГП. Загальна антиоксидна властивість організму визначається, згідно з дослідженнями [15], як комбінація узгодженої роботи трьох ферментативних систем: селензалежної ГП, каталази та Cu-Zn-залежної СОД. Найбільший протекторний ефект зумовлений роботою саме ГП, а найменший пов'язаний із функціонуванням СОД. Проміжна роль відводиться КАТ. Проте, як зазначають ці автори, навіть незначне інгібування ГП за фізіологічних умов спричиняє зростання токсичних ефектів на підвищення концентрації АФК, тоді як Cu-Zn-залежна СОД найменше серед наведених ферментів чутлива до аналогічного інгібування. Тому важливою є послідовна скоординована взаємодія каскадів ферментних систем, що й забезпечує надійність їх роботи.

Дослідження активності ГР і ГП під дією блокатора синтази оксиду азоту засвідчило неоднозначні зміни показників, зумовлені чутливістю до впливу гіпоксичного фактора. У ВР організмів спостерігалось зниження активності ГР і ГП до контрольних значень, у НР щурів, навпаки, активувалися ці ферменти значно вище рівня інтактних тварин. Можливо, саме ці механізми запобігають надмірному утворенню ендogenous оксиду азоту в НР тварин. Вони полягають у захисному ефекті ряду препаратів за умов дії цитотоксичних концентрацій NO, які викликають незворотні ефекти інгібування мітохондріального дихання пероксинітрином. Таке внутрішньоклітинне утворення пероксинітриду є основним механізмом модуляції функцій мітохондрій і зумовлене іонами кальцію [12, 13].

Наступним етапом нашого дослідження стало вивчення концентрації церулоплазміну (ЦП) – мідьвмісного білка, який регулює вільнорадикальний метаболізм і володіє рядом антиоксидних властивостей. Вони полягають у здатності взаємодіяти із супероксидом та перекисом водню. ЦП окиснює двовалентне залізо до тривалентного з паралельним відновленням кисню до води. Показано, що така ферментативна активність необхідна для зв'язування заліза з феритином і зумовлює оксидазні властивості крові. Зниження концентрації ЦП викликає різке зниження синтезу гему в мітохондріях. Вплив донора оксиду азоту за цих умов призводив до зростання вмісту ЦП у двох групах щурів, однак був більш вираженим у ВР. Разом із тим, вплив блокатора NOS у першій групі удвічі знижував концентрацію ЦП порівняно з вихідним рівнем. Для НР щурів ефект дії блокатора реалізувався через зростання вмісту ЦП. Отже, оксидазні властивості крові значною мірою зумовлені функціонуванням NO-ергічних механізмів і можуть коригуватися введенням блокаторів синтази оксиду азоту. Це може бути одним з основних механізмів формування адаптаційних слідових механізмів при дії екстремальних факторів довкілля, пов'язаних із функціонуванням залізовмісних білків крові.

Важливим неспецифічним фактором регуляції ПОЛ за умов дії різноманітних чинників є структурний антиоксидант. Під ним розуміють комплекс властивостей мембрани, який обмежує доступність поліненасичених жирних кислот – субстратів ПОЛ – для молекулярного кисню та каталізаторів ПОЛ. Важливим підтвердженням його ролі є факт різкого збільшення швидкості ПОЛ при дії хаотропних агентів, які порушують впоряд-

ковану організацію ліпідних та білкових компонентів мембрани та підвищують їх молекулярну рухливість. До них відносять високі концентрації жирних кислот, лізофосфоліпідів, сполуки з детергентоподібною дією. Вплив донора NO у BP і HP щурів зумовлював зниження процесів ліпероксидації в обох групах тварин, яке ми оцінювали за зростанням вмісту у крові первинних (дієнових кон'югат) і вторинних (МДА) продуктів ПОЛ. L-аргінин сприяв ефективному зниженню процесів ПОЛ у крові й тканинах, а введення блокатора синтази оксиду азоту L-NNA нівелювало ці ефекти.

Отже, NO-залежні механізми, що запобігають ефективному обмеженню вільнорадикального окиснення при екстремальних навантаженнях, як зазначено в [1, 7, 13], полягають у зниженні внутрішньоклітинної концентрації кальцію шляхом інгібування Ca^{2+} -АТФ-ази та здатності збільшувати активність ферментів АОЗ і експресію генів, що їх кодують. Окрім того, сама молекула NO володіє значними антиоксидними властивостями. Дані про роль NO у попередженні адгезії й агрегації тромбоцитів зумовлюють його важливе значення в обмеженні тромбоутворення при стресі

й, відповідно, у зниженні таких негативних проявів тривалого стресу, як ішемічні ушкодження міокарда і мозку. Тому можна передбачити, що зростання вмісту NO, спричинене введенням донорів NO, сприятиме надмірному обмеженню активації стрес-системи, а зниження продукції оксиду азоту при введенні блокаторів цього процесу призводитиме до збільшення ушкоджувальних ефектів факторів середовища. Однак отримані нами результати свідчать про існування тонких регуляторних механізмів, пов'язаних із функціонуванням холінергічних і адренергічних механізмів регуляції, які у кінцевому підсумку і зумовлюють високу та низьку резистентність до дії не тільки гіпоксичного, а й інших негативних факторів довкілля [6], і повинні враховуватися при фармакологічній корекції.

ВИСНОВОК. Регуляторні системи NO неоднозначно пов'язані з функціонуванням системи АОЗ та ПОЛ і залежать від резистентності до гіпоксії.

Дослідження проведено за підтримки Західноукраїнського біомедичного дослідницького центру.

ЛІТЕРАТУРА

1. Волин М.С., Дэвидсон К.А., Камински П.М. и др. Механизмы передачи сигнала оксидант – оксид азота в сосудистой ткани // Биохимия. – 1998. – **63**, вып.7. – С. 958-965.
2. Гаврилов В.Б., Гаврилова А.П., Мажуль Л.М. Анализ методов определения продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови по тесту с тиобарбитуровой кислотой // Вопр. мед. хим – 1987. – **33**, № 1. – С. 118-122.
3. Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии. – Минск: Беларусь, 1982. – С. 219-220.
4. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. и др. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988. – **1**. – С.16-19.
5. Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.И. Простой и чувствительный метод определения супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина // Вопр. мед. хим. – 1990. – **2**, № 5. – С. 88-91.
6. Кургалюк Н.М., Шостаковська І.В. Вплив альфа-кетоглутарату натрію на активність ферментів переамінування та сукцинатдегідрогенази у щурів з різною резистентністю до гіпоксії // Фізіол.

журн. – 1999. – **45**, № 6. – С. 51-58.

7. Малышев И.Ю., Манухина Е.Б. Стресс, адаптация и оксид азота // Биохимия. – 1998. – **63**, вып. 7. – С. 992-1006.

8. Моин В.М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах // Лаб. дело. – 1986. – № 12. – С. 724-727.

9. Путилина Ф.Е. Определение активности глутатионредуктазы // Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен). – Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. – С. 181-183.

10. Стальная И. Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот / Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С. 63-64.

11. Тимирбулатов Т.А., Селезнев С.И. Метод определения интенсивности свободнорадикального окисления липидсодержащих компонентов крови и его диагностическое значение // Лаб. дело. – 1988. – № 4. – С. 209-211.

12. Brown G. Nitric oxide regulates mitochondrial respiration and cell functions by inhibiting cytochrome oxidase // FEBS Lett. – 1995. – **369**. – P. 136-139.

13. Gross S., Wolin M. Nitric oxide: pathophysiological mechanism // *Ann. Rev. Physiol.* – 1995. – 57. – P. 737- 769.
14. Ingwall J., Kelly R. Nitric oxide, myocard oxygen consumption and ATP synthesis // *Circ. Res.* – 1998. –

83. – P. 1067-1068.

15. Michiels C., Raes M., Toussaint O., Remade J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress // *Free Rad. Biol. Med.* – 1994. – 17, № 3. – P. 235-248.

ВЛИЯНИЕ ОКСИДА АЗОТА НА МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ СОДЕРЖАНИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В АДАПТАЦИОННЫХ ОТВЕТАХ ОРГАНИЗМОВ С РАЗЛИЧНОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ К ДЕЙСТВИЮ ГИПОКСИЧЕСКОГО ФАКТОРА

Н.Н. Кургалюк, О.В. Иккерт, О.В. Горынь, С.К. Гордий, Т.В.Серебровская¹, М.А. Галькив
ЛЬВОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. И.Я. ФРАНКО
ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ ИМ. А.А. БОГОМОЛЬЦА НАН УКРАИНЫ¹

Резюме

Исследованы изменения активности ферментов антиоксидантной защиты (АОЗ) (супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, церулоплазмина) и перекисного окисления липидов (ПОЛ) в крови и тканях крыс с разной резистентностью к гипоксии при внутрибрюшинном введении донора оксида азота L-аргинина и блокатора NO-синтазы L-NNA. Установлено, что регуляторные системы NO неоднозначно связаны с функционированием системы АОЗ и ПОЛ и зависят от резистентности к гипоксии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: антиоксидантная защита, супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, церулоплазмин, перекисное окисление липидов, резистентность.

THE INFLUENCE OF NITRIC OXIDE ON REGULATIVE MECHANISMS OF ACTIVE OXYGEN FORM CONTENT IN ADAPTIVE ANSWERS OF RATS WITH DIFFERENT RESISTANCE TO HYPOXIA

N.M. Kurhalyuk, O.V. Ikkert, O.V. Horyn, S.K. Hordiy, T.V. Serebrovska¹, M.O. Galkiv
LVIV NATIONAL UNIVERSITY BY I.YA. FRANKO
INSTITUTE OF PHYSIOLOGY BY O.O. BOHOMOLETZ OF NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE OF UKRAINE¹

Summary

We have study the effect of exogenous donor of nitric oxide L-arginine and NO-synthase inhibitor L-NNA intraperitoneal injection on antioxidant enzymes activity (AO) (superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, ceruloplasmine concentration) and processes of lipid peroxidation in blood and tissues of rats with different resistance to hypoxia. Our data confirm suggesting that NO is a major regulator in the AO and limit damage influence of active oxygen forms content, action precursor NO L-arginine might be capable of protective role in various disorders which are connected with hypoxia factor.

KEY WORDS: nitric oxide, L-arginine, L-NNA, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, ceruloplasmine, lipid peroxidation, different resistance to hypoxia.

Отримано 16.10.2000 р.

Адреса для листування: Н.М. Кургалюк, кафедра фізіології людини і тварин, Львівський національний університет ім. І.Я. Франка, вул. Грушевського, 4, Львів, 79000, Україна.

ФЕНОМЕН ВИВІЛЬНЕННЯ Ag^+ -ЧУТЛИВИХ SH-ВМІСНИХ НЕБІЛКОВИХ СПОЛУК ПРИ ВЗАЄМОДІЇ АЛАНІН-АМІНОТРАНСФЕРАЗИ Й АСПАРТАТ-АМІНОТРАНСФЕРАЗИ СИРОВАТКИ КРОВІ ЗІ СУБСТРАТАМИ ТА ЙОГО ДІАГНОСТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ

В.В. Костюшов, О.Л. Тимчишин, В.В. Морозкін, О.О. Мардашко¹, Н.В. Костюшова¹
ЦЕНТРАЛЬНИЙ ВІЙСЬКОВИЙ КЛІНІЧНИЙ ГОСПІТАЛЬ, ОДЕСА
ОДЕСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ¹

При деяких патологічних станах, поряд із підвищенням активності аланін-амінотрансферази (АлАТ) і аспартат-амінотрансферази (АсАТ) сироватки крові, взаємодія цих ферментів із субстратами супроводжується феноменом вивільнення Ag^+ -чутливих SH-вмісних небілкових з'єднань. Їх виявляють у небілкових фракціях реакційних сумішей "субстрат-фермент", після діалізу вони зникають. При нормальній активності АлАТ і АсАТ цей феномен спостерігають не в аналогічних реакційних сумішах (у здорових осіб), а в деяких пацієнтів-реконвалесцентів. Висловлено припущення, що феномен є вторинною супровідною тілселективною реакцією, що, мабуть, опосередковується конформаційними та/чи іншими процесами в реакційних сумішах. Наявність або відсутність зазначеного феномена при взаємодії АлАТ і АсАТ сироватки крові із субстратами може побічно свідчити про приховані порушення структурно-функціонального стану ферментів, навіть при нормальній їх активності.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: Ag^+ -чутливі SH-вмісні небілкові з'єднання, ферменти, АлАТ і АсАТ, субстрати, реакційна суміш "субстрат-фермент".

ВСТУП. Субстрати при взаємодії з ферментами можуть як збільшувати, так і зменшувати стабільність їх молекул [14], тому біохімічні реакції "субстрат-фермент" супроводжуються зміною їх макроструктури і конформаційними перетвореннями [17]. Згідно з даними літератури, при цих процесах у білках, як правило, перебігають, так звані, вторинні супровідні реакції [1, 15], до яких, серед інших, відносять зміну активності ферментів, а також підвищення реактивності сульфгідрильних -SH-груп білкових і небілкових з'єднань [1, 9, 15].

У цьому плані становлять інтерес дані про те, що імунні реакції, поряд із зміною макроструктури антигенів і антитіл, які взаємодіють між собою [2, 3], супроводжуються паралельною реакцією – феноменом вивільнення Ag^+ -чутливих SH-вмісних небілкових сполук у реакційних сумішах "антиген-антитіло" [4, 5].

Природно, що виникає питання про наявність аналогічного феномена при високо-специфічній міжмолекулярній взаємодії в реакційних сумішах "субстрат-фермент". Тому наше дослідження присвячено вивченню процесу вивільнення Ag^+ -чутливих SH-вмісних небілкових з'єднань у реакційних сумішах при

© В.В. Костюшов – к.м.н., О.Л. Тимчишин, В.В. Морозкін, О.О. Мардашко – д.м.н., проф., Н.В. Костюшова, 2001.

взаємодії ферментів АлАТ і АсАТ сироваток крові зі субстратами як при нормальній, так і при підвищеній активності цих ферментів.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. У сироватці крові (СК) трьох груп обстежуваних визначали активність ферментів: аланін-амінотрансферази (СК-АлАТ) і аспартат-амінотрансферази (СК-АсАТ). 1-а (контрольна) група – 52 практично здорові донори, в яких активність АлАТ і АсАТ була нормальною. 2-а – 29 осіб із захворюваннями внутрішніх органів інфекційної і неінфекційної природи, в яких виявлено підвищення активності зазначених ферментів. 3-я – 85 пацієнтів-реконвалесцентів, які у минулому перенесли різні гострі захворювання чи загострення хронічних захворювань, у яких активність зазначених ферментів була в межах норми.

Активність АлАТ і АсАТ визначали методом Райтмана-Френкеля [7]. Для визначення активності АсАТ застосовували як субстрати (S-) α -кетоглутарову і D,L-аспарагінову кислоти (S-АсАТ), активності АлАТ – α -кетоглутарову кислоту і D,L-аланін (S-АлАТ). Зазначені субстрати було взято з діагностичних наборів виробництва АТ "Реагент" (Дніпропетровськ).

Поряд із вивченням активності АлАТ і АсАТ, у реакційних сумішах (СК-АлАТ + S-АлАТ і

СК-АсАТ + S-АсАТ) визначали кількість Ag^+ -чутливих SH-груп. Для готування реакційних сумішей в окремі пробірки відбирали по 225 мкл СК донорів і СК пацієнтів та додавали по 25 мкл субстратів (S-АлАТ і S-АсАТ), термостатували 30 хв при температурі 37°C , після чого проводили дослідження.

Визначали вміст Ag^+ -чутливих SH-груп у білкових і небілкових фракціях СК і реакційних сумішей. Для одержання небілкових фракцій в окремі пробірки відбирали по 200 мкл СК чи реакційних сумішей, потім додавали до них по 100 мкл 5 % метафосфорної кислоти. Пробірки центрифугували при 3000 об./хв протягом 30 хв і одержували прозорі супернатанти – небілкові фракції.

Для кількісного визначення SH-груп застосовували метод амперометричного титрування розчином азотнокислого срібла (AgNO_3) [10, 16]. Тому в даному повідомленні мова йде тільки про так звані Ag^+ -чутливі SH-групи, які містяться в білкових і небілкових фракціях біоматеріалу. Дослідження проводили на приладі для амперометричного титрування (виробництво “Химлаборприбор” ТУ 25-11-364-69, СРСР).

Зазначений метод деякою мірою має переваги перед іншими [8] й обраний нами ось чому. Було враховано те, що він розроблений винятково для вивчення відновних властивостей меркаптану (високоактивного відновника за рахунок SH-груп), що дозволило застосувати прийом так званого “зворотного” титрування [10]. Підібрано відповідні умови, завдяки яким було досягнуто високої специфічності іонів срібла відносно SH-груп і достатньої чутливості методу. З’явилась також можливість кількісно оцінити SH-групи в малих обсягах біоматеріалу, причому в його білковій і небілковій фракціях. Значно скорочено час, необхідний для проведення титрування. Прилад нескладний у технічному виконанні, не вимагає дорогих реактивів та імуносенсорів і може бути застосований у стаціонарних діагностичних лабораторіях.

“Зворотне” титрування Ag^+ -чутливих SH-груп здійснюють таким чином. В кювету для титрування вносять 25 мл $0,02\text{ M}$ трис-буфера (трис-гідроксиметил-амінометан), потім двічі (з коротким інтервалом, необхідним для реєстрації величини струму) додають по 200 мкл 10^{-4} M розчину AgNO_3 . Внаслідок цього в електричній схемі установки, яка складається із занурених в кювету для титрування індикаторного платинового електрода і каломельного електрода порівняння, виникає дифузний струм як результат відновлення іонів срібла

на платиновому індикаторному електроді. Величину струму контролюють за допомогою мікроамперметра. Приріст струму відбувається пропорційно доданому розчину AgNO_3 . Він, як правило, є стабільним і складає, відповідно, 40 і 80 нА. Потім в кювету для титрування вносять біоматеріал. Іони срібла зв’язуються SH-групами з утворенням стійкого меркаптиду [10], у результаті чого відбувається пропорційне зниження величини вихідного дифузного струму. Кількість Ag^+ -чутливих SH-груп у біоматеріалі еквівалентна кількості зв’язаних іонів срібла, яку розраховували за формулами [10]. Для цього використовували ЕОМ “Pentium 200”, яка була сполучена із пристроєм, що реєструє.

При проведенні амперометричного титрування враховано дані ряду авторів про те, що іони срібла в низьких, особливо еквімолярних концентраціях, вибірково реагують у трис-буфері із SH-групами, причому їх спорідненість набагато більша, ніж до інших функціональних груп [12, 13]. Тому титрування здійснювали 10^{-4} M розчином AgNO_3 . Згідно з даними цих авторів, титрування в трис-буфері, по-перше, практично виключає вплив кожної з відомих природних амінокислот на зв’язування SH-груп з іонами срібла, по-друге, трис-буфер, утворюючи комплексні з’єднання із сріблом, практично виключає неспецифічне зв’язування іонів срібла і запобігає їх взаємодії з інтерферуючими речовинами.

Аналізували зв’язування іонів срібла компонентами, які входили до складу реакційних сумішей: субстратами, розчинами фосфатного буфера, метафосфорної кислоти, хлориду натрію і дистильованою водою. Їх вносили в кювету для титрування і за зміною величини вихідного дифузійного струму оцінювали інтерферуючу дію цих компонентів.

Вивчали взаємодію SH-груп розчину монотіолу-цистеїну (2-аміно-3-меркаптопропанова кислота) з еквімолярними концентраціями розчину AgNO_3 . Для цього готували *ex tempore* на $0,02\text{ M}$ трис-буфері стандартний $1 \cdot 10^{-4}\text{ M}$ розчин цистеїну.

Аналізували вплив субстратів на вміст SH-груп $1 \cdot 10^{-4}\text{ M}$ розчину цистеїну (тіолопривний ефект субстратів). Для цього в пробірки вносили по 225 мкл $1 \cdot 10^{-4}\text{ M}$ розчину цистеїну, потім додавали по 25 мкл кожного із субстратів у відповідному робочому розведенні, зазначеному вище, після чого їх термостатували при температурі 37°C протягом 180 хв. Про тіолопривний ефект субстратів судили за зміною кількості Ag^+ -чутливих SH-груп цистеїну на 30, 60, 120 і 180 хв його інкубації.

Уточнювали природу Ag⁺-чутливих SH-груп у небілкових фракціях реакційних сумішей. Для цього проводили діаліз небілкових фракцій проти дистильованої води протягом 16 год при температурі 4 °С, потім повторно визначали вміст Ag⁺-чутливих SH-груп. Для виключення впливу фактора часу на досліджувані показники в процесі діалізу досліджували аналогічний біоматеріал, який не піддавали діалізу.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Контрольне титрування дозволило встановити, що 200 мкл 1·10⁻⁴ М розчину цистеїну зв'язує еквімолярну кількість AgNO₃, що еквівалентно 0,02 мікромолям SH-груп. Крім того, після інкубації 1·10⁻⁴ М розчину цистеїну із субстратами відзначається статистично достовірне зниження кількості Ag⁺-чутливих SH-груп, порівняно з аналогічним показником у розчинах цистеїну, в які не було додано зазначені субстрати (табл. 1).

Встановлено, що розчини фосфатного буфера, метафосфорної кислоти, хлориду натрію та дистильована вода, а також субстрати при додаванні їх в кювету для титрування не зв'язують іони срібла і величина вихідного дифузійного струму не змінюється.

У білкових фракціях СК донорів і СК пацієнтів виявлено Ag⁺-чутливі SH-групи, різниця між вмістом яких була статистично достовірною (табл. 2). Кількість Ag⁺-чутливих SH-груп у небілкових фракціях СК донорів і СК пацієнтів перебувала за межами чутливості використовуваного нами методу (табл. 2).

У донорів нормальна активність АлАТ і АсАТ сироваток крові не супроводжується вивільненням Ag⁺-чутливих SH-вмісних небілкових з'єднань при взаємодії цих ферментів із субстратами. Про це свідчить той факт, що небілкові фракції реакційних сумішей (СК-АлАТ + S-АлАТ, СК-АсАТ + S-АсАТ) не зв'язують іони срібла, які знаходяться в осередку для титрування, і величина вихідного дифузійного струму не змінюється (табл. 3).

У пацієнтів 2-ї групи, поряд із підвищенням активності ферментів АлАТ і АсАТ сироватки крові, одночасно виявлено Ag⁺-чутливі SH-групи в небілкових фракціях реакційних сумішей (табл. 3). У зв'язку з цим, додатково було проведено діаліз цих небілкових фракцій, після якого вони втратили здатність зв'язувати іони срібла.

У деяких осіб 3-ї групи, незважаючи на нормальні показники активності АлАТ і АсАТ сироватки крові, виявлено Ag⁺-чутливі SH-групи в небілкових фракціях реакційних сумішей: СК-АлАТ + S-АлАТ – у 11 з 53 пацієнтів, СК-АсАТ + S-АсАТ – у 20 з 69 пацієнтів (табл. 3).

Встановлено також, що в донорів і пацієнтів 3-ї групи вміст Ag⁺-чутливих SH-груп у білкових фракціях реакційних сумішей (СК-АлАТ + S-АлАТ, СК-АсАТ + S-АсАТ) був значно меншим, порівняно з їх вихідним вмістом у СК донорів і СК пацієнтів 3-ї групи. У хворих 2-ї групи в білкових фракціях реакційних сумішей кількість Ag⁺-чутливих SH-груп була незначно вищою, ніж їх вміст у СК цих пацієнтів. Крім того, в донорів у білкових фракціях реакційних сумішей кількість Ag⁺-чутливих SH-

Таблиця 1 – Вплив субстратів на вміст Ag⁺-чутливих SH-груп у 1·10⁻⁴ М розчині цистеїну

Досліджуваний біоматеріал	n	Вміст Ag ⁺ -чутливих SH-груп, мкмоль/л							
		30 хв		60 хв		120 хв		180 хв	
		M±m	p	M±m	p	M±m	p	M±m	p
Розчин цистеїну	10	97,7±0,8	>0,05*	87,9±0,1	<0,001*	76,3±0,03	<0,001*	71,8±0,1	<0,001*
Розчин цистеїну + S~АлАТ	10	77,5±0,1	<0,001**	74,1±0,1	<0,001**	67,2±0,1	<0,001**	56,6±0,1	<0,001**
Розчин цистеїну + S~АсАТ	10	81,5±0,1	<0,001**	77,5±0,1	<0,001**	72,9±0,03	<0,001**	52,0±0,04	<0,001**

Примітка. * – порівняно з аналогічним показником у 1·10⁻⁴ М розчині цистеїну;

** – порівняно з аналогічним показником у розчині цистеїну, в який не додано субстрати;

n – кількість досліджень.

Таблиця 2 – Вміст Ag⁺-чутливих SH-груп у білкових і небілкових фракціях сироваток крові

Досліджуваний біоматеріал	n	Вміст Ag ⁺ -чутливих SH-груп, мкмоль/л				
		в небілкових фракціях		в білкових фракціях		
		M±m	*	M±m	p ₁	p ₂
СК донорів	52	*		447,7±9,9		
СК пацієнтів 2-ї групи	29	*		324,2±4,6	<0,01	
СК пацієнтів 3-ї групи	85	*		372,9±10,4	<0,01	<0,05

Примітка. n – кількість досліджень;

p₁ – порівняно з аналогічним показником у СК донорів;

p₂ – порівняно з аналогічним показником у СК пацієнтів 2-ї групи;

* – вміст показника за межами чутливості використовуваного методу.

Таблиця 3 – Активність ферментів сироваток крові й вміст Ag⁺-чутливих SH-груп у небілкових фракціях реакційних сумішей

Обстежені	Активність ферменту, min-max, нмоль/год·л		Вміст Ag ⁺ -чутливих SH-груп, мкмоль/л (M±m)		
			СК~АлАТ + S~АлАТ	СК~АсАТ + S~АсАТ	p
Донори	АлАТ	0,10-0,28	*		
	АсАТ	0,12-0,43	*		
Пацієнти 2-ї групи	АлАТ	0,69-2,72	17,5±1,6		
	АсАТ	0,47-2,10	15,1±1,9		
Пацієнти 3-ї групи	АлАТ	0,15-0,58	2,3±0,5		
	АсАТ	0,20-0,44	3,6±0,6		
					<0,001
					<0,001

Примітка. * – вміст показника за межами чутливості використовуваного методу;
p – порівняно з аналогічним показником у СК пацієнтів 2-ї групи.

груп була значно більшою порівняно з їх вмістом в аналогічних реакційних сумішах у пацієнтів 2-ї і 3-ї груп. У хворих 2-ї групи кількість Ag⁺-чутливих SH-груп у білкових фракціях усіх реакційних сумішей була нижчою, ніж аналогічний показник у пацієнтів 3-ї групи, хоча ця відмінність була статистично недостовірною (табл. 4).

При проведенні досліджень ми спеціально підбирали сироватку крові донорів і пацієнтів, у небілкових фракціях яких Ag⁺-чутливі SH-групи перебували за межами чутливості використовуваного методу. Це пов'язано з тим, що в попередній нашій роботі було описано феномен спонтанного вивільнення Ag⁺-чутливих SH-вмісних небілкових з'єднань у небілкових фракціях сироватки крові пацієнтів при тромбозах, ускладнених інфарктом чи некрозом (інфаркт міокарда чи головного мозку, нирок, селезінки чи легень, панкреанекроз, некроз брижі кишечника тощо) [6]. Причому феномен з'являється за кілька годин, а іноді й днів, до виникнення інфаркту (некрозу). Максимум зростання їхньої кількості припадає на 3-5 день від моменту виникнення інфаркту (некрозу). Якщо надалі кількість Ag⁺-чутливих SH-груп продовжує збільшуватися, то результат захворювання, як правило, летальний. Успішне завершення захворювання супроводжується зникненням цих з'єднань на 10-15 день від моменту появи інфаркту (некрозу).

Спонтанне вивільнення Ag⁺-чутливих SH-вмісних небілкових з'єднань свідчить про

несприятливі процеси в організмі. Воно, мабуть, відображає патобіохімічні денатураційні процеси в білках СК. Крім того, ряд авторів вказують на те, що істотні порушення макроструктури білків і зв'язані з ними денатураційні процеси супроводжуються так званими вторинними супровідними реакціями. До них, серед інших, відносять зміну активності ферментів, а також зміну реакційної здатності SH-груп, які містяться в білках і в небілкових сполуках [1, 9, 15].

На достатню чутливість використаного методу вказує контрольне титрування Ag⁺-чутливих SH-груп у стандартних 1·10⁻⁴ М розчинах цистеїну. Застосувавши цей метод, нам вдалось знайти феномен у реакційних сумішах "субстрат-фермент" при деяких патологічних станах.

Про те, що феномен не є артефактом, свідчать такі результати. По-перше, встановлено, що компоненти реакційних сумішей, а також субстрати, не зв'язують іони срібла і не змінюють величину вихідного дифузійного струму. По-друге, субстрати проявляють тілопривний ефект. Так, після інкубації 1·10⁻⁴ М розчину цистеїну із S~АсАТ і S~АлАТ відзначається статистично достовірне зниження кількості Ag⁺-чутливих SH-груп, порівняно з аналогічним показником у розчинах цистеїну, в які не було додано зазначені субстрати. Незважаючи на це, виявлено, що при деяких патологічних станах, поряд із підвищенням активності ферментів АлАТ і АсАТ сироваток крові, в небілкових

Таблиця 4 – Вміст Ag⁺-чутливих SH-груп у білкових фракціях реакційних сумішей

Обстежені	n	Вміст Ag ⁺ -чутливих SH-груп, мкмоль/л							
		СК~АлАТ + S~АлАТ				СК~АсАТ + S~АсАТ			
		M±m	p ₁	p ₂	p ₃	M±m	p ₁	p ₂	p ₃
Донори	52	402,6±16,1	<0,02			404,7±14,5	<0,02		
Пацієнти 2-ї групи	29	338,4±13,3	<0,02	<0,01		347,0±16,1	>0,05	<0,01	
Пацієнти 3-ї групи	85	343,4±8,6	>0,05	<0,01	>0,05	355,2±7,9	<0,02	<0,01	>0,05

Примітка. p₁ – порівняно з аналогічним показником у СК донорів і пацієнтів;
p₂ – порівняно з аналогічним показником у реакційних сумішах донорів;
p₃ – порівняно з аналогічним показником у реакційних сумішах пацієнтів 2-ї групи.

фракціях реакційних сумішей “субстрат-фермент” з’являються Ag^+ -чутливі SH-групи. Причому після діалізу вони зникають, і це свідчить про те, що вони входять до складу небілкових з’єднань. При нормальній активності ферментів сироваток крові аналогічний феномен виявлено не в здорових осіб, але в деяких пацієнтів-реконвалесцентів. Однак у білкових фракціях усіх досліджуваних нами реакційних сумішей, навпаки, спостерігалось зменшення кількості Ag^+ -чутливих SH-груп.

У зв’язку з цим можна висловити припущення, що при патологічних станах високо специфічна міжмолекулярна взаємодія ферментів АлАТ і АсАТ із субстратами супроводжується вторинною супровідною тіолселективною реакцією, яка, очевидно, опосередковується конформаційними чи іншими процесами. Не виключено, що це зумовлено істотними порушеннями впорядкованості макроструктури цих ферментів сироваток крові пацієнтів під дією патогенних факторів. У результаті їх взаємодія із субстратом може супроводжуватися десорбцією зв’язаних з ферментами SH-вмісних небілкових з’єднань. Феномен, мабуть, може відображати патобіохімічні денатураційні процеси в зазначених реакційних сумішах.

Слід зазначити, що аналогічний феномен виявлено і при імунних реакціях “антиген-антитіло” [4], тому не виключено, що його виникнення в реакційних сумішах “субстрат-фермент” при патології можливе тільки тоді, коли ферменти набувають імунних властивостей.

Становлять інтерес результати, згідно з якими, при нормальній активності ферментів сироваток крові пацієнтів-реконвалесцентів усе ж таки вдалося знайти феномен вивільнення Ag^+ -чутливих SH-вмісних небілкових сполук у реакційних сумішах “субстрат-фермент”. Такі дані побічно свідчать про приховані порушення макроструктури ферментів, які не можна виявити шляхом визначення тільки активності ферментів.

ВИСНОВКИ. 1. Спонтанне вивільнення Ag^+ -чутливих SH-вмісних небілкових сполук свідчить про несприятливі процеси в організмі.

2. Поряд із визначенням активності ферментів варто додатково оцінювати вторинні супровідні реакції. Наявність чи відсутність феномена вивільнення Ag^+ -чутливих SH-вмісних небілкових сполук в реакційних сумішах АлАТ і АсАТ із субстратами може побічно свідчити про приховані порушення структурно-функціонального стану ферментів навіть при нормальній їх активності.

ЛІТЕРАТУРА

1. Белицер В.А. Макроструктура и денатурационные превращения белков // Укр. біохім. журн. – 1962. – **34**, № 2. – С. 290-320.

2. Иммунология / Под ред. У. Пола. – М.: Мир, 1988. – 476 с.

3. Клиническая иммунология и аллергология / Под ред. Л. Йегера. – М.: Медицина, 1990. – **1**. – 528 с.

4. Костюшов В.В. Ампертитрометричний імуноаналіз тіолопривних механізмів взаємодій антигену з антитілами // Одеський мед. журн. – 1998. – № 6. – С. 11-14

5. Костюшов В.В., Костюшова Л.А., Тымчишин О.Л. Феномен появления свободных небелковых SH-групп как показатель реактивности белков острой фазы сыворотки крови в иммунологических реакциях *in vitro* с диагностическими моноспецифическими антисыворотками // Буковинський мед. вісн. – 2000. – № 3. – С. 74-79.

6. Костюшов В.В. Феномен спонтанної появи вільних небілкових SH-груп у депротеїнізованій сироватці крові та його діагностичне значення // Одеський мед. журн. – 1999. – № 3. – С. 9-11

7. Лабораторные методы исследований в клинике: Справочник / Под ред. В.В. Меньшикова. – М.: Медицина. – 1987. – 368 с.

8. Основы аналитической химии / Под ред. Ю.А. Золотова. – Кн. 2. Методы химического анализа. – 2-е изд., переработ. и доп. – М.: Высш. шк., 2000. – 494 с.

9. Попов Е.М. Естествознание и проблема белка. – М.: Высш. шк., 1989. – 416 с.

10. Соколовский В.В. Тиолдисульфидное соотношение крови как показатель состояния неспецифической резистентности организма // Медицинская академия последипломного образования. – С.-Пб., 1996. – 33 с.

11. Торчинский Ю.М. Сера в белках. – М.: Наука, 1977. – 303 с.

12. Benesch R.E., Benesch R. Amperometric determination of soluble mercapto groups (glutathione) in blood and tissues // Arch. Biochem. – 1950. – **28**, № 8. – P. 43-47.

13. Benesch R.E., Lardi H.A., Benesch R. The sulfhydryl groups of crystalline proteins // The journal of biological chemistry. – 1955. – **216**, № 2. – P. 663-676.

14. Grisolia S., Joyce B. K. Distribution of two types of diphosphoglycerate mutase and D-2,3-diphosphoglyceric acid // J. Biol. – 1959. – **234**, № 6. – P. 1335-1337.

15. Joly M.A physiko-chemical approach to the denaturation of proteins. – L.-N.-Y., 1965. – P. 105.

16. Kolthoff I.M., Harris W.E. Ampermetric Titration

of Mercaptan with silver nitrate Using the Rotating Platinum Electrode // Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. – 1946. – **18**, № 3. – P. 161-162.

17. Massey V., Hofmann T., Palmer G. The relation of function and structure in lipoyl dehydrogenase // J. Biol. Ghem. – 1962. – **237**, № 12. – P. 3820-3828.

ФЕНОМЕН ВЫСВОБОЖДЕНИЯ Ag^+ -ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ SH-СОДЕРЖАЩИХ НЕБЕЛКОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ АЛАНИН-АМИНОТРАНСФЕРАЗЫ И АСПАРТАТ-АМИНОТРАНСФЕРАЗЫ СЫВОРОТКИ КРОВИ С СУБСТРАТАМИ И ЕГО ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

В.В. Костюшов, О.Л. Тымчишин, В.В. Морозкин, А.А. Мардашко¹, Н.В. Костюшова¹
ЦЕНТРАЛЬНЫЙ ВОЕННЫЙ КЛИНИЧЕСКИЙ ГОСПИТАЛЬ, ОДЕССА
ОДЕССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ¹

Резюме

При некоторых патологических состояниях, наряду с повышением активности аланин-аминотрансферазы (АлАТ) и аспартат-аминотрансферазы (АсАТ) сывороток крови, взаимодействие этих ферментов с субстратами сопровождается феноменом высвобождения Ag^+ -чувствительных SH-содержащих небелковых соединений. Их обнаруживают в небелковых фракциях реакционных смесей "субстрат-фермент", после диализа они исчезают. При нормальной активности АлАТ и АсАТ этот феномен наблюдают не в аналогичных реакционных смесях (у здоровых лиц), а у некоторых пациентов-реконвалесцентов. Высказано предположение, что феномен является вторичной сопутствующей тиолселективной реакцией, которая, очевидно опосредуется конформационными и/или другими процессами в реакционных смесях. Наличие или отсутствие указанного феномена при взаимодействии АлАТ и АсАТ сывороток крови с субстратами может косвенно свидетельствовать о скрытых нарушениях структурно-функционального состояния ферментов, даже при нормальной их активности.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: Ag^+ -чувствительные SH-содержащие небелковые соединения, ферменты, АлАТ и АсАТ, субстраты, реакционная смесь "субстрат-фермент".

PHENOMENON OF Ag^+ -SENSING -SH-CONTAINING NON-PROTEIN COMBINATIONS RELEASE CONNECTIONS AT INTERREACTION OF ALANINE AMINOTRANSFERASE AND ASPARTAT AMINOTRANSFERASE OF BLOOD SERUM WITH SUBSTRATUMS AND ITS DIAGNOSTIC VALUE

V.V. Kostyushov, O.L. Tymchyshyn, V.V. Morozkin, A.A. Mardashko¹, N.V. Kostyushova¹
CENTRAL MILITARY CLINICAL HOSPITAL, ODESA
ODESA STATE MEDICAL UNIVERSITY¹

Summary

At some morbid conditions, simultaneously with an enhancement of alanine of aminotransferase (AlAT) and aspartat aminotransferase (AsAT) activity of blood serum, the interreaction of these enzymes with substratums is accompanied by phenomenon of a release of Ag^+ -sensing -SH-containing non-protein combinations. They are found in non-protein fractions of reactionary mixtures "substratum-enzyme" and they vanish after dialysis. At normal activity of AlAT and AsAT this phenomenon is not found in similar reactionary mixtures (in healthy persons), and is found in some patients – convalescents. The supposition is pronounced that the phenomenon is secondary concomitant thiolselective reaction, which is apparent conformation and – or by other processes in reactionary mixtures. Availability or absence of the mentioned phenomenon at reaction of AlAT and AsAT of blood serum with substratums can indicate the latent violations of a structural and functional condition of enzymes, even at their normal activity.

KEY WORDS: Ag^+ -sensing -SH-containing non protein combinations, enzymes, AlAT and AsAT, substratum's, reactionary mixture "substratum-enzyme".

Отримано 19.04.2001 р.

Адреса для листування: В.В.Костюшов, а/с 74, 65089, Одеса-89, Україна.

АКТИВНІСТЬ ХІМАЗИ, ТОНІНУ ТА ЕЛАСТАЗИ У ЩУРІВ ЗА УМОВ ОКИСНЮВАЛЬНОГО СТРЕСУ, ВИКЛИКАНОГО ВВЕДЕННЯМ ХЛОРИДУ РТУТІ

Л.М. Самохіна, Т.О. Познахарева, А.О. Самохін
ІНСТИТУТ ТЕРАПІЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ, ХАРКІВ

Досліджували характер змін активності хімази, тоніну й еластази в серці, легенях, печінці та нирках щурів при окиснювальному стресі, викликаному введенням хлориду ртуті. Виявлено, що введення хлориду ртуті в організм призводить до зростання активності еластази внаслідок безпосереднього й опосередкованого респіраторного вибуху в нейтрофілах. Показано активацію хімази в печінці, що може бути хемотаксичним чинником для нейтрофілів і сприяти порушенню діяльності печінки. Відмічено зростання активності тоніну, що може зумовлювати вазоконстрикторні ефекти іонів ртуті.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: хімаза, тонін, еластаза, окиснювальний стрес, хлорид ртуті.

ВСТУП. Ртуть – високотоксичний мікроелемент, унікальний серед важких металів, що існує в декількох фізичних і хімічних формах, які викликають токсичні ефекти в більшості органах. Він потрапляє в організм з водою, їжею тощо, швидко акумулюється в окремих тканинах і призводить до появи окиснювального пошкодження, мітохондріальної дисфункції та загибелі клітин [10]. Прямої кореляції між виникненням патологічних проявів та концентрацією ртуті в тканинах немає [9]. Токсичну дію іонів ртуті пов'язують з їх високою спорідненістю із сульфгідрильними групами білків, пептидів, амінокислот, ушкодженням біологічних мембран, а саме з підвищенням проникності мембран для Ca^{2+} і деполаризацією внутрішніх мембран мітохондрій, що супроводжується зростанням споживання ними кисню та вивільненням H_2O_2 [17]. Розвивається окиснювальний стрес, який призводить до виникнення багатьох патологічних процесів [8]. Вони опосередковані участю базофілів (опасистих клітин), макрофагів і нейтрофілів. За багато ефектів опасистих клітин (ОК) і нейтрофілів відповідають протеолітичні ферменти, які містяться в гранулах цих клітин.

Нами відмічено підвищення активності нейтральних протеїназ, значною мірою в печінці та нирках, при введенні $HgCl_2$, що корелює з найбільшим накопиченням ртуті в організмі [5]. Характер впливу іонів ртуті на

© Л.М. Самохіна – к.б.н., Т.О. Познахарева, А.О. Самохін, 2001.

активність окремих ферментів ОК та нейтрофілів, зокрема хімази й еластази, не висвітлено. Еластаза нейтрофілів і хімаза ОК є біохімічними маркерами запальних процесів. Крім того, хімаза – один з основних ферментів утворення вазоконстрикторного пептиду ангіотензину II (АII), поряд із тоніном, катепсином G, тканинним активатором плазміногену, які розщеплюють не тільки ангіотензин I (AI), але й ангіотензиноген [19].

Мета дослідження – вивчити характер змін активності хімази, тоніну та еластази в тканинах щурів при окиснювальному стресі, який викликано введенням хлориду ртуті.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. В експериментах використано щурів лінії Вістар 2-3-місячного віку (n=6). Тваринам вводили внутрішньочеревно хлорид ртуті з розрахунку 0,7 мг на 100 г маси тіла. Контрольній групі (n=6) – фізіологічний розчин у відповідній дозі. Щурів декапітували через 2 години після ін'єкції хлориду ртуті. Печінку перфузували охолодженим фізіологічним розчином. Тканини легень, серця, печінки та нирок (300 мг) гомогенізували в 3 мл Na-фосфатного буфера при pH 7,4 і температурі 4-6 °С. Отримані гомогенати центрифугували 10 хв при 5000 об./хв на центрифугу РС-6 при 4-6 °С. Зберігали до аналізу при -20 °С.

Активність хімази, тоніну та еластази визначали з використанням високочутливого ферментативного методу [4, 6].

Для визначення активності тоніну попередньо пригнічували активність калікреїн-подібних ферментів у дослідних зразках додаванням 1:1 за об'ємом апротиніну (20 мкг/мл) та інкубували 5 хв при температурі 37 °С. Потім проводили реакцію розщеплення іммобілізованого комплексу маркерного ферменту і протамінсульфату.

Активність хімази і тоніну виражали у відсотках розщеплення субстрату.

Для оцінки еластази субстратом був N-Succinyl-Ala-Ala-Val, як контрольні зразки використовували еластазу активністю від 0,0005 до 0,5000 ОД/мл.

Під час проведення досліджень застосовували пероксидазу хрому, протамінсульфат, еластазу (Росія), СІТ виробництва "Reanal" (Угорщина), фрагмент 4-8 All, апротинін, N-Succinyl-Ala-Ala-Val фірми "ICN" (США), полістиролові плашки фірми "Linbro" (США) і багатоканальний мікроспектрофотометр фірми "Flow" (Великобританія).

Отримані дані обробляли математично за методом Стюдента-Фішера.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Результати дослідження активності хімази, тоніну та еластази наведено в таблиці 1. Показано, що за умов введення хлориду ртуті в організм активність вказаних ферментів зростає. Суттєве підвищення рівня хімази, порівняно з контролем, виявлено в печінці. Активність тоніну більше зростала в серці, печінці та нирках, щодо еластази, – то в серці та печінці вона збільшується у 3 рази, в легенях і нирках – у 2 рази.

Підвищення активності всіх відзначених протеїназ у печінці може зумовлюватись її участю у знешкодженні токсичних речовин, перерозподілі їх по всьому організму і вивільненні з жовчу. Токсичні ефекти ртуті в

печінці відзначено раніше [7]. Зростання активності хімази в печінці вказує на локальну активацію ОК. Хімаза може бути хемотаксичним чинником для нейтрофілів, еозинофілів та інших клітин, що беруть участь у розвитку запальних процесів [15]. Одним із цитокінів, який також вивільняється ОК, є фактор некрозу пухлин- α (ФНП- α). Це основний чинник, що підвищує експресію молекул міжклітинної адгезії (ICAM), які активують нейтрофіли [12]. Під дією іонів ртуті також активуються В- і Т-лімфоцити, які можуть бути джерелом ФНП- α . HgCl₂ може активувати протеїнкіназу С, яка індукує вхід Ca²⁺ до клітини, що може відповідати за активацію нейтрофілів. Усе це можна розглядати як механізми опосередкованої дії іонів ртуті на вивільнення еластази нейтрофілів та розвиток деструктивних процесів.

Підвищення активності еластази у всіх досліджених органах також може зумовлюватись тим, що іони ртуті безпосередньо викликають активацію респіраторного вибуху в нейтрофілах [3]. У результаті збільшуються споживання кисню й утворення супероксид-аніонів, що генерують такі похідні, як H₂O₂, хлораміни, гіпохлорна кислота. Даний процес сприяє дегрануляції цитоплазматичних гранул, що призводить до вивільнення протеолітичних ферментів, серед яких найбільша частка припадає на еластазу і катепсин G [1].

Еластаза має широку субстратну специфічність, спроможна розщеплювати протеоглікани, фібронектин, колагени, фібриноген/фібрин, чинники згортання крові, білки системи комплементу, імуноглобуліни. Вона є важливим патогенетичним чинником у розвитку багатьох захворювань, може призводити до ушкодження сполучної тканини, збільшення адгезивності й проникності ендотелію, деструкції еластичного каркаса органів і тканин.

Таблиця 1 – Активність хімази, тоніну та еластази в тканинах щурів за умов введення хлориду ртуті

Біологічна рідина	Дослідний зразок	Активність хімази, %	Активність тоніну, %	Активність еластази, ОД/мл
Легені	Контроль	8,41±2,28	17,16±5,51	0,0032±0,0007
	Дослід Р	16,41±5,02 >0,05	38,78±1,38 <0,01	0,0074±0,0022 <0,05
Серце	Контроль	7,84±3,04	7,76±2,18	0,0075±0,0021
	Дослід Р	14,12±5,05 >0,05	39,50±3,98 <0,001	0,0306±0,0117 <0,05
Печінка	Контроль	9,01±3,08	7,39±2,04	0,0062±0,0019
	Дослід Р	22,36±1,48 <0,01	37,99±3,73 <0,001	0,0301±0,0102 <0,05
Нирки	Контроль	12,57±4,27	13,99±3,08	0,0095±0,0026
	Дослід Р	18,54±4,04 >0,05	45,99±3,03 <0,001	0,0214±0,0094 <0,05

Примітка. Р – зміни достовірні порівняно з контролем.

Панкреатична еластаза може індукувати вивільнення цитокінів запальними клітинами і регулювати розвиток ушкодження печінки [21]. Активацію еластази вважають важливим ефектом на легеневу тканину, пов'язаним із порушенням балансу в системі "протеїназа-інгібітор протеїназ" у результаті окиснювального стресу [13, 16].

Підвищення рівня тоніну в серці та нирках свідчить про активацію альтернативних шляхів утворення All і може відповідати за ефекти ртуті на судини, які призводять до вазоконстрикції. Це підтверджує гіпотезу про стимуляцію вивільнення вазоконстрикторних агентів, опосередкованого утворенням супероксид-аніонів за умов дії іонів ртуті [11]. Активація тоніну в печінці вказує на ймовірне його джерело, а підвищення його рівня в легенях може бути пов'язаним з патогенетичними механізмами виникнення легеневої гіпертензії.

Слід зазначити, що раніше нами відмічено підвищення рівня α -2-МГ у легенях, печінці та

нирках [5]. α -2-МГ пригнічує широкий спектр протеїназ, і його рівень зростає при різних гострих та хронічних запальних процесах [20]. α -2-МГ є суттєвим інгібітором хімази, пригнічує тонін [14, 18]. Підвищення активності вказаних протеїназ за умов окиснювального стресу може бути пов'язаним з окисненням α -2-МГ гіпохлоридом, втратою ним здатності пригнічувати активність протеїназ [21].

ВИСНОВКИ: 1. Введення хлориду ртуті в організм призводить до зростання активності еластази внаслідок безпосереднього й опосередкованого виникнення респіраторного вибуху в нейтрофілах.

2. Ртуть викликає активацію хімази в печінці, що може бути хемотаксичним чинником для нейтрофілів і сприяти порушенню діяльності печінки.

3. Під впливом іонів ртуті зростає активність тоніну, що може зумовлювати її вазоконстрикторні ефекти.

ЛІТЕРАТУРА

1. Белова Л.А. Биохимия процессов воспаления и поражения сосудов. Роль нейтрофилов // Биохимия. – 1997. – **62**, № 6. – С. 659-669.

2. Волохова Н.И., Осташкова В.В., Болотников И.А. Накопление и экскреция Hg⁺⁺ на фоне подкормки двуйодистой ртутью (HgCl₂) лабораторных животных // Фундаментальные и прикладные аспекты современной биохимии. – Санкт-Петербург, 1998. – **1**. – С. 371-375.

3. Менщикова Е.Б., Зенков Н.К. Окислительный стресс при воспалении // Усп. совр. биол. – 1997. – **117**, № 2. – С. 155-172.

4. Пат. 20171 Україна, МПК С 12 Q 1/38. Спосіб визначення активності протеїназ або їх інгібіторів в біологічних рідинах / Л.М. Самохіна, А.А. Дубінін (Україна). – Опубл. 25.12.97. – Бюл. № 6. – 3 с.

5. Самохин А.А. Влияние пентоксифиллина на систему протеиназа-ингибитор протеиназ у крыс при введении хлорида ртути // Труды научн. конф., посвященной 100-летию со дня рождения акад. И.Н. Буланкина "Научное наследие акад. И.Н. Буланкина и его развитие в современной биохимии". – Харьков, 2001. – С. 68-69.

6. Самохіна Л.М., Гольдрін Є.М., Коваль С.М. Система протеїназа-інгібітор протеїназ у хворих гіпертонічною хворобою під впливом антигіпертензивної терапії // Мед. хім. – 2000. – **2**, № 3. – С. 11-15.

7. Afoime O.J., Orisakwe O.E., Ndubuka G.I. et al. Zinc protection of mercury-induced hepatic toxicity in mice // Biol. Pharm. Bull. – 2000. – **23**, № 3. – P. 305-308.

8. Ariza M.E., Bijur G.N., Williams M.V. Lead and mercury mutagenesis: role of H₂O₂, superoxide dismutase, and xantine oxidase // Env. Mol. Mutagen. – 1998. – **31**, № 4. – P. 352-361.

9. Asano S., Eto K., Kurisaki E. et al. Review article: acute inorganic mercury vapor inhalation poisoning // Pathol. Int. – 2000. – **50**, № 3. – P. 169-174.

10. Crinnion W.J. Environmental medicine, part three: long-term of chronic low-dose mercury exposure // Altern. Med. Rev. – 2000. – **5**, № 3. – P. 209-223.

11. Da Cunha V., Souza H.P., Rossoni L.V. et al. Effects of mercury on the isolated rats tail vascular bed are endothelium-dependent // Arch. Contam. Toxicol. – 2000. – **39**, № 1. – P. 124-130.

12. Frangogiannis N.S., Lindsey M.L., Michael L.M. Residential cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF- α , initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion // Circulation. – 1998. – **98**, № 7. – P. 699-710.

13. Garcon G., Campion J., Hannotiaux M.H. et al. Modification of the proteinase/anti-proteinase balance in the respiratory tract of Sprague-Dawley rats after single intratracheal instillation of benzo[A]pyrene-coated onto Fe(2)O(3) particles // J. Appl. Toxicol. – 2000. – **20**, № 4. – P. 265-271.

14. Harvima I.T., Naukkarinen A., Paukkonen K. et al. Mast cell tryptase and chymase in developing and mature psoriatic lesions // Arch. Dermatol. Res. – 1993. – **285**, № 4. – P. 184-192.

15. He S., Walls A.F. Human mast cell chymase induces the accumulation of neutrophils, eosinophils

and other inflammatory cells in vivo // Br. J. Pharmacol. – 1998. – **125**, № 7. – P. 1491-1500.

16. Heunks L.M., Bast A., Van Herwaarden C.L. et al. Effects of emphysema and training on glutathione oxidation in the hamster diaphragm // J. Appl. Physiol. – 2000. – **88**, № 6. – P. 2054-2061.

17. Hultberg B., Anderson A., Isaksson A. Alteration of thiols metabolism in human cell lines induced by low amounts of copper, mercury or cadmium ions // Toxicology. – 1998. – **126**, № 3. – P. 203-212.

18. S.D. Mikolajczyk, L.S. Millar, A. Kumar, M.S. Saedi. Human glandular kallikrein, hK2, shows arginine-restricted specificity and forms complexes with plasma pro-

tease inhibitors // Prostate. – 1998. – **34**, № 1. – P. 44-50.

19. Inoue K., Nishimwa H., Kubota J. et al. Alternative angiotensin 11 formation in rats arteries occurs only at very high concentrations of angiotensin I // Hypertension. – 1999. – **34**, № 3. – P. 525-530.

20. Isaac L., Florido M.P., Fecchio D. Murine alpha-2-macroglobulin increase during inflammatory responses and tumour growth // Inflamm. Res. – 1999. – **48**, № 8. – P. 446-452.

21. Wu S.M., Pizzo S.V. Mechanism of hypochloride-mediated inactivation of proteinase inhibition by alpha-2-macroglobulin // Biochem. – 1999. – **38**, № 42. – P. 13983-13990.

АКТИВНОСТЬ ХИМАЗЫ, ТОНИНА И ЭЛАСТАЗЫ У КРЫС ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ, ВЫЗВАННОМ ВВЕДЕНИЕМ ХЛОРИДА РТУТИ

Л.М. Самохина, И.А. Познахарева, А.А. Самохин
ИНСТИТУТ ТЕРАПИИ АКАДЕМИИ МЕДИЦИНСКИХ НАУК УКРАИНЫ, ХАРЬКОВ

Резюме

Исследовали характер изменений активности химазы, тонина, эластазы в сердце, легких, печени и почках крыс при окислительном стрессе, вызванном введением хлорида ртути. Выявлено, что введение хлорида ртути в организм приводит к возрастанию активности эластазы вследствие непосредственного и опосредованного респираторного взрыва в нейтрофилах. Показано активацию химазы в печени, что может быть гемотаксическим фактором для нейтрофилов и способствовать нарушению деятельности печени. Отмечено повышение активности тонина, что может обуславливать вазоконстрикторные эффекты ионов ртути.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **химазы, тонин, эластаза, окислительный стресс, хлорид ртути.**

CHYMASE, TONIN AND ELASTASE ACTIVITY IN RATS AT THE OXIDATIVE STRESS CAUSED BY INTRODUCTION OF MERCURY CHLORIDE

L.M. Samokhina, T.A. Poznakhareva, A.A. Samokhin
INSTITUTE OF THERAPY OF ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES, KHARKIV

Summary

Character of changes of chymase, tonin and elastase activities in rat's heart, lungs, liver, kidney in conditions of oxidative stress, induced by mercury chloride, was investigated. It was revealed that introduction of mercury chloride in organism resulted in increase of elastase activity owing to direct and mediated respiratory explosion in neutrophils. The chymase activation in liver is shown, that can be hemotaxis factor for neutrophils and promote occurrence of liver functioning disturbances. The increase of tonin activity is marked, which can stipulated vasoconstrictory effects of mercury ions.

KEY WORDS: **chymase, tonin, elastase, oxidative stress, mercury chloride.**

Отримано 12.06.2001 р.

Адреса для листування: Л.М. Самохіна, інститут терапії Академії медичних наук України, Харків, 61189, Україна.

ОСОБЛИВОСТІ ВПЛИВУ КАРНІТИНУ ХЛОРИДУ НА ЕНЕРГЕТИЧНІ ПРОЦЕСИ У ПЕЧІНЦІ ТВАРИН РІЗНИХ ВІКОВИХ ГРУП ЗА УМОВИ ІНТОКСИКАЦІЇ СОЛЯНОКИСЛИМ ГІДРАЗИНОМ

Я.І. Гонський, І.М. Кліщ, М.М. Корда, Н.В. Банадига
ТЕРНОПІЛЬСЬКА ДЕРЖАВНА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ ІМ. І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО

Вивчено вплив карнітину хлориду на активність процесів дихання та окисного фосфорилування, а також вміст аденілових нуклеотидів у печінці тварин різних вікових груп з токсичним ураженням, викликаним уведенням солянокислого гідрозину. Встановлено, що карнітин найбільш виражено нормалізує досліджувані процеси у статевозрілих щурів, дещо менше – у статевонезрілих, а у старих тварин ефект був найслабшим. Це пояснюється особливостями фармакокінетики препарату, а також загальним зниженням інтенсивності обмінних процесів у тварин даної вікової категорії.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: токсичне ураження печінки, енергетичні процеси, солянокислий гідрозин, карнітину хлорид, вікові категорії.

ВСТУП. Пригнічення енергетичних процесів відіграють значну роль у патогенезі токсичних уражень печінки різної етіології [7, 8, 10]. Вони можуть виникати внаслідок роз'єднувальної дії продуктів вільнорадикального окиснення, яке активується при впливі більшості ксенобіотиків, а також безпосереднього ковалентного зв'язування деяких з них із макромолекулами – компонентами дихального ланцюга мітохондрій [2, 5, 10]. Одним із найбільш поширених ксенобіотиків, що проявляють виражену стеатогенну дію, є гідрозин, який широко використовується в різних галузях промислового та сільськогосподарського виробництва, медицині тощо [20, 21]. У механізмі його дії вплив на функціональну активність мітохондрій займає важливе місце [21].

Енергетичний стан клітини, як відомо [15, 16], визначається стаціонарними концентраціями АТФ, АДФ, АМФ та сумарною концентрацією аденілових нуклеотидів і контролюється енергетичним зарядом (ЕЗ) – відношенням $(\text{АТФ}+1/2 \text{АДФ})/(\text{АТФ}+\text{АДФ}+\text{АМФ})$. Однак, як свідчать результати, отримані рядом дослідників, енергетичні процеси в гепатоцитах тварин різних вікових груп мають певні особливості [8, 9, 12, 14], що може позначитися на вираженні пригнічувального впливу на них ксенобіотиків.

Перспективним препаратом з вираженою антистеатогенною дією є карнітину хлорид – низькомолекулярна органічна сполука, що

здійснює перенесення ацильних залишків через внутрішню мітохондріальну мембрану в матрикс, де відбувається їх β -окиснення [1, 13, 17, 19]. Крім цього, беручи участь у процесах трансметилування, карнітин покращує білковий обмін [1]. Показано також його позитивний вплив на функціональну активність мітохондрій за деяких патологічних станів [18].

Виходячи з цього, метою нашої роботи було вивчення особливостей дії карнітину хлориду на стан енергетичних процесів у тварин різного віку за умов токсичного ураження солянокислим гідрозином.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Експерименти провели на 72 нелінійних щурах-самцях. У дослідах використовували тварин таких вікових періодів: статевонезрілі, молоді (3-х міс., маса – 70-100 г), статевозрілі, дорослі (6-8 міс., маса – 180-220 г) та старі (20-24 міс., маса – 300 г і більше). Піддослідних щурів було поділено на 3 групи: I – інтактні; II – контрольні (уражені солянокислим гідрозином); III – ліковані (солянокислий гідрозин + карнітину хлорид). Солянокислий гідрозин тваринам II та III груп вводили внутрішньочеревно в дозі 56 мг/кг у вигляді 6 % водного розчину [21]. Фармакопейний 20 % розчин карнітину хлориду розводили в 10 разів ізотонічним розчином хлориду натрію і вводили внутрішньочеревно одночасно із солянокислим гідрозином у дозі 50 мг/кг [19]. Тварин декапітували під легким ефірним наркозом через 24 год після введення отрути.

© Я.І. Гонський – д.м.н., проф., І.М. Кліщ – к.м.н., М.М. Корда – д.м.н., Н.В. Банадига – д.м.н., 2001.

У тканині печінки визначали вміст АТФ, АДФ та АМФ за допомогою наборів "Test Combination" фірми "Boehringer Mannheim". З отриманих показників розраховували енергетичний заряд (ЕЗ) за формулою: $EZ = (ATF + 1/2 ADF) / (ATF + ADF + AMF)$ [15]. У виділених методом диференційного центрифугування мітохондріях печінки полярографічним методом визначали швидкість дихання та окиснювального фосфорилування на полярографі РА-2 (Чехословаччина) з використанням відкритого платинового електрода [4]. На отриманих полярограмах розраховували такі показники: V_2 – дихання в присутності екзогенного субстрату (сукцинат, 6 мМ); V_3 – до суспензії мітохондрій, крім сукцината, додано акцептор фосфату (АДФ, 200 мкМ); V_4 – в системі вичерпується акцептор фосфату, але концентрація субстрату залишається високою; $V_{днф}$ – швидкість дихання в присутності роз'єднувача (2,4-ДНФ, 50 мкМ). Розраховували також дихальний контроль (ДК) за Чансом, який визначається співвідношенням V_3/V_4 , ефективність фосфорилування доданого АДФ (АДФ/О), а також показник співвідношення V_2/V_4 , який дозволяє оцінити здатність мітохондріальних мембран утримувати енергетичний потенціал. Визначали активність сукцинатдегідрогенази (СДГ) [10], цитохром-оксидази (ЦО) [6] та протонної АТФ-ази (H^+ -АТФ-ази) [3] – ключових ферментів, які беруть участь у процесах енергоутворення на різних його етапах.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Дослідження активності енергетичних процесів у печінці здорових тварин різних вікових груп показало, що між ними існують певні відмінності. Так, нами відмічено інтенсивніше поглинання кисню в станах V_2 , V_3 , V_4 мітохондріями молодих щурів, порівняно з дорослими та старими, проте введення в середовище інкубації ДНФ найбільш інтенсивно стимулювало дихання в дорослих тварин. У цій віковій групі найвищими були також показники ДК та АДФ/О, що свідчить про більші потенційні можливості дихального ланцюга статевозрілих щурів. Показники дихання у старих тварин були нижчими, порівняно з дорослими та молодими. Достовірно нижчими у даній групі щурів були також вміст АТФ та сумарна концентрація вільних аденілових нуклеотидів. Вміст АДФ та АМФ мав тенденцію до зменшення, проте воно було недостовірним. У молодих тварин також зафіксовано зниження, порівняно з дорослими, сумарного вмісту аденілових нуклеотидів, в

основному за рахунок АТФ, що позначилось і на показнику енергетичного заряду, проте це зниження було менш вираженим, ніж у старих. У старих тварин нами зафіксована також нижча активність ключових ферментів, які беруть участь у енергетичних процесах – СДГ, ЦО та H^+ -АТФ-ази порівняно з дорослими та молодими. Таким чином, енергетичний обмін у печінці інтактних молодих і, особливо, старих тварин характеризується певним напруженням, зумовленим як зростанням витрачання енергії, так і зниженням енергоутворюючої здатності мітохондрій, на що вказують і інші автори [98].

Введення солянокислого гідразину призводило до виражених змін енергетичних процесів у тварин усіх вікових періодів, проте спостерігались і певні особливості (табл. 1). Пригнічення поглинання кисню в метаболічних станах V_2 , V_3 , V_4 мітохондрій дорослих щурів було у відсотковому відношенні нижчим, ніж молодих та старих, а у присутності ДНФ ($V_{днф}$) це зменшення було недостовірним також і у молодих тварин. Якщо взяти до уваги те, що в щурів цих вікових періодів не достовірно знижувався коефіцієнт V_2/V_4 , який вказує на здатність внутрішньої мітохондріальної мембрани утримувати енергетичний потенціал, то можна припустити, що в молодих та дорослих тварин введення солянокислого гідразину призводить тільки до функціональних порушень дихального ланцюга, тоді як у старих відбуваються деструктивні зміни. Показник ефективності фосфорилування також був найнижчим у старих тварин.

При дослідженні вмісту аденілових нуклеотидів та енергетичного заряду гепатоцитів (рис. 1) ми виявили більш виражені порушення цих показників у старих щурів. Так, вміст АТФ у даній групі знизився в 1,7 раза, тоді як у 3 місячних він зменшився в 1,5, а в дорослих – в 1,3 раза. Концентрація АДФ знижувалась майже пропорційно вмісту АТФ, а АМФ – підвищувалась у дорослих, а в молодих та старих була нижчою, ніж у інтактних тварин відповідної вікової групи. Змінювався і сумарний вміст аденілових нуклеотидів (табл. 2). Порушення цих показників призводило, проте, лише до незначного зниження енергетичного заряду гепатоцитів. Як відомо [10, 15, 16], енергетичний заряд є фундаментальним параметром, який відображає кількість макроергічних зв'язків АТФ та АДФ у загальному фонді аденілових нуклеотидів та контролює енергетичний стан клітин. Підвищення енергетичного заряду викликає активацію ферментів, що утилізують АТФ і утворюють

Таблиця 1 – Показники дихання мітохондрій печінки щурів з токсичним ураженням солянокислим гідразином та корекцією карнітину хлоридом ($M \pm m$)

Вік	Показники	Групи тварин		
		Інтактні, n=6	Солянокислий гідразин, n=6	Солянокислий гідразин+ карнітину хлорид, n=6
Молоді	V_2	48,4±3,6	26,2±2,8*	36,8±2,9**
	V_3	99,6±5,3	45,8±5,3*	61,3±5,1**
	V_4	37,5±4,2	28,6±1,9	31,2±1,8
	$V_{днф}$	158,6±11,0	120,5±6,9	136,4±6,4**
	ДК	2,60±0,20	1,60±0,16*	1,96±0,18**
	АДФ/О	2,01±0,05	1,34±0,04*	1,68±0,06**
	V_2/V_4	1,29±0,06	0,91±0,04	1,17±0,05**
Дорослі	V_2	41,8±2,1	30,9±2,6*	35,1±2,2**
	V_3	97,3±4,0	66,8±4,8*	77,9±3,1**
	V_4	36,2±3,0	34,7±2,7	35,2±2,9
	$V_{днф}$	161,7±12,9	142,6±6,8	155,7±7,2**
	ДК	2,70±0,21	1,91±0,17*	2,21±0,15
	АДФ/О	2,08±0,08	1,49±0,05*	1,68±0,07**
	V_2/V_4	1,15±0,07	0,89±0,05	0,99±0,02
Старі	V_2	37,4±2,8	25,3±2,1*	28,9±2,2
	V_3	85,3±3,9	48,8±4,4*	55,4±4,2
	V_4	33,2±2,2	29,7±2,0*	30,2±1,9
	$V_{днф}$	142,8±10,2	128,3±5,4*	132,6±6,1
	ДК	2,50±0,12	1,64±0,15*	1,83±0,14
	АДФ/О	1,92±0,05	1,23±0,04*	1,48±0,07**
	V_2/V_4	1,12±0,08	0,85±0,04*	0,96±0,04

Примітка. Тут і в наступних таблицях * – зміни достовірні, порівняно з інтактними тваринами відповідного вікового періоду; ** – зміни достовірні, порівняно з тваринами, ураженими солянокислим гідразином.

АДФ чи АМФ, та інактивацию реакцій протилежного характеру. Зменшення ж енергетичного заряду, навпаки, супроводжується активацією синтезу АТФ та інактивацию її розпаду. Величина енергетичного заряду підтримується на постійному рівні завдяки збереженню рівноваги між АТФ, АДФ і АМФ у клітині, яка здійснюється аденілаткіназою.

При впливі солянокислого гідразину зниження вмісту АТФ, імовірно, компенсується утворенням цього макроерга при взаємодії двох молекул АДФ, що підтверджується пропорційним зменшенням вмісту АДФ в

печінці піддослідних тварин. У результаті цієї реакції утворюється також АМФ, проте ми не зафіксували підвищення вмісту даного нуклеотиду, що узгоджується з дезаміназним механізмом стабілізації енергетичного заряду [10, 20], зниження якого компенсується дезамінуванням АМФ в ІМФ. Таким чином, величина енергетичного заряду, незважаючи на суттєві порушення параметрів, які його утворюють, майже не змінюється.

Суттєвих змін зазнавали також мітохондріальні енергозабезпечуючі ферменти (табл. 3). Нами зафіксовано достовірне зниження ЦО та

Таблиця 2 – Концентрація аденілових нуклеотидів та аденілатний енергетичний заряд гепатоцитів щурів з токсичним ураженням солянокислим гідразином та корекцією карнітину хлоридом ($M \pm m$)

Групи тварин	Вік	Показники				
		АТФ, ммоль/кг	АДФ, ммоль/кг	АМФ, ммоль/кг	АТФ+АДФ+АМФ, ммоль/кг	ЕЗ
Інтактні, n=6	молоді	3,12±0,21	0,66±0,03	0,29±0,02	4,07±0,25	0,84±0,06
	дорослі	3,45±0,18	0,71±0,03	0,31±0,03	4,48±0,23	0,85±0,07
	старі	2,85±0,12	0,72±0,02	0,33±0,03	3,71±0,18	0,83±0,05
Солянокислий гідразин, n=6	молоді	2,08±0,15	0,58±0,04	0,20±0,02	2,86±0,26	0,83±0,04
	дорослі	2,73±0,13	0,63±0,03	0,38±0,02	3,74±0,38	0,82±0,06
	старі	2,15±0,11	0,60±0,02	0,26±0,03	3,01±0,25	0,81±0,03
Солянокислий гідразин+карнітину хлорид, n=6	молоді	2,56±0,11	0,62±0,03	0,25±0,03	3,43±0,32	0,84±0,05
	дорослі	2,86±0,14	0,68±0,03	0,36±0,04	3,90±0,34	0,82±0,03
	старі	2,28±0,12	0,61±0,02	0,29±0,03	3,18±0,26	0,81±0,04

Таблиця 3 – Активність сукцинатдегідрогенази, цитохромоксидази та протонної АТФ-ази в печінці щурів різних вікових груп з ураженням солянокислим гідразинном та корекцією карнітину хлоридом ($M \pm m$)

Вік	Показники	Групи тварин		
		Інтактні, n=6	Солянокислий гідразин, n=6	Солянокислий гідразин+карнітину хлорид, n=6
молоді	СДГ, ммоль/кг·хв	10,38±0,78	7,31±0,44*	9,44±0,62**
	ЦО, ммоль/кг·хв	8,59±0,33	6,65±0,32*	7,35±0,18**
	H ⁺ -АТФ-аза, мк-ат Р/ кг·хв	350,1±12,2	206,5±16,0*	288,7±11,4**
дорослі	СДГ, ммоль/кг·хв	9,21±0,32	7,72±0,79	8,68±0,65**
	ЦО, ммоль/кг·хв	8,51±0,40	5,92±0,46*	7,79±0,12**
	H ⁺ -АТФ-аза, мк-ат Р/кг·хв	345,0±13,4	211,2±14,6*	287,7±6,47**
старі	СДГ, ммоль/кг·хв	7,86±0,30	6,51±0,34*	7,12±0,84
	ЦО, ммоль/кг·хв	7,80±0,22	5,05±0,15*	6,56±0,24
	H ⁺ -АТФ-аза, мк-ат Р кг·хв	328,7±10,8	224,8±9,3*	265,1±9,14**

H⁺-АТФ-ази у тварин всіх вікових груп, а активність СДГ достовірно знижувалась у молодих та старих тварин.

Застосування карнітину хлориду призводило до певної нормалізації показників енергетичного обміну. Спостерігалось підвищення функціональної активності дихального ланцюга внутрішньої мітохондріальної мембрани, на що вказує як збільшення швидкості поглинання кисню мітохондріями, так і зростання активності ферментів, які беруть участь у його функціонуванні (рис. 2). Звертає на себе увагу те, що нормалізуючий вплив на мітохондрії старих тварин був вираженим дещо менше, ніж молодих та дорослих. Це може бути наслідком, з одного боку, більш глибокого їх ураження солянокислим гідразинном та зниженням загальної активності метаболічних проце-

сів у печінці тварин цього вікового періоду [7, 12], а з іншого – особливостей фармакокінетики препарату [1]. В результаті, у старих щурів значно меншою мірою відновлюється синтез аденілових нуклеотидів, причому в основному за рахунок АТФ та АДФ.

ВИСНОВКИ. 1. Токсичне ураження солянокислим гідразинном призводить до пригнічення функціональної активності мітохондрій печінки, причому в старих тварин спостерігаються найбільш виражені зміни.

2. Введення карнітину хлориду покращує процеси дихання та окисного фосфорилування в мітохондріях печінки уражених гідразинном тварин.

3. Ефективність карнітину хлориду найвища в дорослих, дещо нижча в молодих,

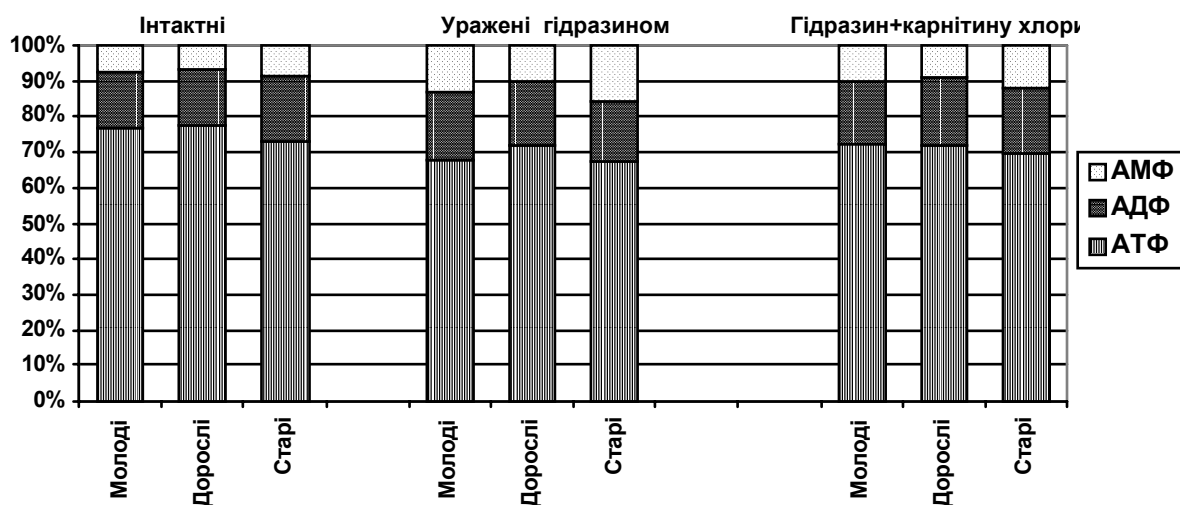


Рис. 1. Співвідношення концентрацій АТФ, АДФ та АМФ у печінці щурів з ураженням солянокислим гідразинном та корекцією карнітину хлоридом.

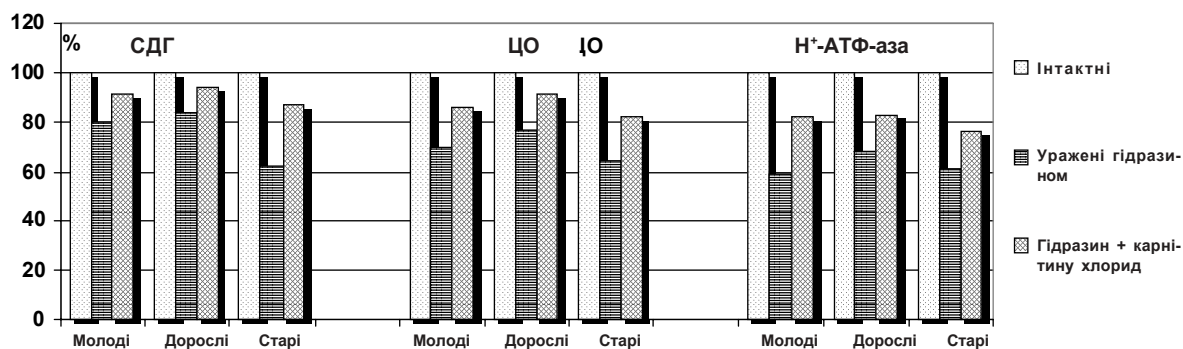


Рис. 2. Активність ферментів енергозабезпечення у печінці щурів з ураженням солянокислим гідразиним та корекцією карнітину хлоридом.

а в старих тварин спостерігалась найменш виражена нормалізуюча дія препарату, що можна пояснити наявністю більш виражених деструктивних змін у мітохондріях, особли-

востями фармакокінетики карнітину та загальним зниженням активності метаболічних процесів у тварин даної вікової категорії.

ЛІТЕРАТУРА

1. Авакумов В.М., Смирнова Т.Н., Клементьева И.В., Кругликова Р.П. Фармакологические свойства карнитина хлорида – анаболического препарата нестероидной природы // Хим.-фарм. журн. – 1988. – № 3. – С. 379-382.
2. Авакян А.Х. Новые молекулярные критерии оценки токсического действия производных гидразина. Активные формы кислорода как ключевые агенты в механизме токсичности // Фармакол. и токсикол. – 1990. – **53**, № 1. – С. 70-73.
3. Губский Ю.И. АТФ-азная активность митохондрий печени крыс при отравлении тетрахлорметаном // Укр. биохим. журн. – 1992. – **68**, № 1. – С. 46-50.
4. Кондрашова М.Н., Мохова Е.Н., Роттенберг Ю.С. Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом / Под ред. Г.М. Франка. – М: Наука, 1973. – 221 с.
5. Костюк В.А. Роль ковалентного связывания и перекисного окисления липидов в повреждении печени четыреххлористым углеродом // Биохимия. – 1991. – **60**, № 10. – С. 1878-1885.
6. Кривченкова Р.С. Определение активности цитохромоксидазы в суспензии митохондрий // В кн.: Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. – С. 47-49.
7. Лемешко В.В. Система микросомального окисления при развитии и старении организма // Биохимия. – 1980. – **45**, № 11. – С. 1964-1969.
8. Лемешко В.В., Калиман П.А., Никитченко Ю.В. Перекисное окисление липидов в постъядерной и микросомальной фракциях гомогенатов печени крыс при старении организма // Биохимия. – 1981. – **46**, № 4. – С. 620-627.
9. Литошенко А.Я. Возвратные особенности содержания аденозинтрифосфатов в регенерирующей печени крыс // Укр. биохим. журн. – 1981. – **53**, № 6. – С. 111 – 113.
10. Макаренко О.Н. Мельничук Д.А., Скорик Л.В. Нарушение энергетического обмена в тканях кролика при аммонийном токсикозе // Укр. биохим. журн. – 1989. – **61**, № 6. – С. 94-98.
11. Прохорова М.И. Методы биохимических исследований. – Л.: Из-во Ленинград. ун-та, 1982. – 272 с.
12. Разумович А.И. Биоэнергетические процессы и старение организма. – Минск, 1972. – 732 с.
13. Сидоряк Н.Г., Волгин Д.В. Влияние L-карнитина на пероксидное окисление и липидный состав сыворотки крови при гемической гипоксии // Укр. биохим. журн. – 1996. – **68**, № 5. – С. 54-58.
14. Физиологические механизмы старения: Сб. Научн. тр. – Л.: Наука. – 1982. – 228 с.
15. Atkinson D.E. Cellular Energy Metabolism and Its Regulation. – New York, 1977. – P. 30-32.
16. Atkinson D.E. The energy charge of adenilate pool as a regulatory parameters // Biochemistry. – 1968. – **2**, № 11. – P. 4030-4034.
17. Brass E.P. Beyerinck R.A. Effect of propionate and carnitine on the hepatic oxidation of short' – and medium chain length fatty acid // Biochem. J. – 1988. – **250**, № 3. – P. 819-825.
18. Lusiak W., Lilly K., That P. Effect of the concentration of carnitine on acetylcarnitine production by rat heart mitochondria oxidizing pyruvate // Nutrition. – 1988. – **4**, № 3. – P. 215 – 219.
19. Richter V., Rassoul F., Shulc G. et al. Carnitine and experimental carbohydrate – induced hyper-

- lipoproteinemia // Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. – 20, № 11. – P. 1129-1137.
1987. – 290, № 1. – P. 138-144. 21. Timbrel J.A., Scales M.D., Streeter A.J. Studies
of hydrazine hepatotoxicity. II. Biochemical findings //
20. Testa B. Metabolism of inhibition of xeno- J. Toxicol. Environ. Health. – 1981. – 10. – P. 955-968.
biotic-metabolising enzymes // Xenobiotic. – 1990. –

ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ КАРНИТИНА ХЛОРИДА НА ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В ПЕЧЕНИ ЖИВОТНЫХ РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП ПРИ ИНТОКСИКАЦИИ СОЛЯНОКИСЛЫМ ГИДРАЗИНОМ

Я.И. Гонский, И.Н. Клищ, М.М. Корда, Н.В. Банадьга
ТЕРНОПОЛЬСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ ИМ. И.Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

Резюме

Изучено влияние карнитина хлорида на активность процессов дыхания и окислительного фосфорилирования, а также содержание адениловых нуклеотидов в печени животных разных возрастных групп с токсическим поражением, вызванным введением солянокислого гидразина. Установлено, что карнитин эффективнее всего нормализует исследуемые процессы у половозрелых, несколько меньше – у половонезрелых и менее всего – у старых крыс. Это объясняется особенностями фармакокинетики препарата, а также общим снижением интенсивности метаболических процессов у животных данной возрастной категории.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: токсическое поражение печени, энергетические процессы, солянокислый гидразин, карнитина хлорид, возрастные категории.

FEATURES OF INFLUENCE OF CARNITINE CHLORIDUM ON ENERGY PROCESSES IN A LIVER OF DIFFERENT AGE GROUPS ANIMALS AT THE INTOXICATION BY HYDRAZINE HYDROCHLORIDE

Ya.I. Honsky, I.N. Klishch, M.M. Korda, N.V. Banadyha
TERNOPIL STATE MEDICAL ACADEMY BY I.YA. HORBACHEVSKY

Summary

The influence of a carnitine chloridum on activity of respiration processes and oxidizing phosphorylation as well as adenylic nucleotides content in a liver of different age categories animals with toxic defeat caused by introduction of hydrazine hydrochloride is investigated. Carnitine has been fixed to be the most effective in normalizing of explored indicies at puberal, a little bit less – at young and the least effective at old animals. It is explained by features of a pharmacokinetics of a drug, and also total downstroke of intensity of metabolic processes at the animals of sectional age category.

KEY WORDS: toxic defeat of a liver, energy processes, hydrazine hydrochloride, carnitine chloridum, age categories.

Отримано 12.07.2001 р.

Адреса для листування: І.М. Клищ, кафедра фармакології, Тернопільська державна медична академія ім. І.Я. Горбачевського, майдан Волі, 1, Тернопіль, 46001, Україна.

ВПЛИВ НИЗЬКОЕНЕРГЕТИЧНОЇ ДІЄТИ НА СКЛАД ПОЛІНЕНАСИЧЕНИХ ЖИРНИХ КИСЛОТ У КРОВІ ХВОРИХ НА ПІЗНЮ ШКІРНУ ПОРФІРІЮ

Е. Донбровська

ГДАНСЬКА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ, ПОЛЬЩА

Групі з 8 пацієнтів із пізньою шкірною порфірією (ПШП) протягом 2-х тижнів було призначено низькоенергетичну (приблизно 500 ккал) фруктово-овочеву дієту. До і через 2 тижні після дієти методом вискоєфективної газової хроматографії в еритроцитах і плазмі досліджено склад поліненасичених жирних кислот (ПНЖК). Активність ензимів, що каталізують перетворення жирних кислот, оцінювали за допомогою непрямого методу, підраховуючи відношення продукту перетворення жирної кислоти до його попередника. Спостерігали тенденцію до нормалізації вмісту ряду жирних кислот, а також активності ферментів, під впливом дієти.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: пізня шкірна порфірія, поліненасичені жирні кислоти, низькоенергетична дієта.

ВСТУП. ПШП характеризується зниженням активності уropорфіриногенної декарбоксілази, гіперпродукцією порфіринів, їх відкладанням у печінці та шкірі, а також кумуляцією заліза в печінці. Ліпіди клітинних мембран, головним чином печінки і шкіри, часто стають об'єктом атаки вільних радикалів, генератором яких можуть бути порфірин і залізо [2]. Ці реакції особливо напружені при недостатньому антиоксидному захисті. Відомо, що жирні кислоти будують клітинні мембрани і від їх складу залежить функціонування цих мембран. Під час попереднього дослідження, проведеного нами у хворих на порфірію, було виявлено нестачу ПНЖК. Оскільки різні дієтичні чинники

можуть впливати на профіль жирних кислот у клітині, метою нашої роботи було дослідити дію низькоенергетичної (500 ккал) фруктово-овочевої дієти на склад жирних кислот мембран еритроцитів і плазми хворих на ПШП.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Обстежено 8 пацієнтів (чоловіків) віком у середньому 53 роки, у яких на підставі типових змін шкіри і підвищеного виділення уро- та копропорфіринів із сечею діагностовано ПШП.

Хворим було призначено низькоенергетичну дієту (близько 500 ккал) (табл. 1), яка складалася з продуктів рослинного походження із низьким вмістом крохмалю,

Таблиця 1 – Кількість енергії і будівельних харчових складників у низькоенергетичній дієті й у рекомендованих нормах харчування

Вид дієти	Енергія		Білки	Вуглеводи	Жири	Холестерин
	ккал/добу	МДж/добу				
Одиниці вимірювання						
Низькоенергетична дієта	511	2,1	15,0 (13 %)	97,0 (84 %)	4,0 (3,5 %)	0
Рекомендована норма харчування	2800	11,7	85,0 (12 %)	400,0 (57 %)	95,0 (30 %)	200
Рекомендована норма харчування/ низькоенергетична дієта	5,5	5,5	5,7	4,1	24	200

(морква, буряк, селера, редиска, ріпа, капуста, салат, петрушка, селера, цибуля, часник, помідори, перець). Дієта урізноманітнювалася вживанням низькоцукристих фруктів (яблук, лимонів). У раціон також входили салати, соки, супи, приправлені сіллю і зеленню. Під час лікування заборонялось вживати високо-

калорійні продукти, такі, як жири, зернові, картопля, продукти тваринного походження тощо. Для пиття подавали фіточаї і негазовану мінеральну воду. Лікування тривало два тижні. Калорійну цінність продуктів вираховували за допомогою таблиць [5]. Склад жирних кислот визначали за допомогою вискоєфективної (капілярної) газової хроматографії [3] у гомогенатах щоденної дієти, а також в еритроцитах

© Е. Донбровська, 2001.

і плазмі хворих до дієтотерапії та через два тижні після її застосування й у контрольній групі з 11 здорових осіб, які перебували на традиційному харчуванні.

Активність окремих ферментів, які каталізують перетворення високоненасичених жирних кислот, визначено опосередковано як відношення продуктів метаболізму жирних кислот до початкової їх концентрації [1]. Дослідження проведено у відділі хімії Гданської політехніки (Польща). Результати опрацьовано статистично. Достовірність різниці результатів верифіковано за допомогою тесту Стюдента.

Таблиця 2 – Відсотковий вміст поліненасичених жирних кислот серій n-6 та n-3, визначених у гомогенаті низькокалорійної фруктово-овочевої дієти

	Серія n-6						Серія n-3			
	18:2	18:3	20:3	20:4	22:4	22:5	18:3	20:5	22:5	22:6
Жирна кислота	18:2	18:3	20:3	20:4	22:4	22:5	18:3	20:5	22:5	22:6
Скорочена назва	LA	GLA	DGLA	AA	DTA	DPA	ALA	EPA	DPA	DHA
%	30,64	0,64	0,21	0,21	1,02	0,11	19,65	0,16	0,27	0,30
Грами	1,530	0,032	0,010	0,010	0,050	0,006	0,980	0,008	0,010	0,015

Серед інших жирних кислот домінували пальмітинова (C 16:0) (22, 48 %) і стеаринова (C 18:0) (8,22 %). Решта жирних кислот виявлялись переважно у слідових кількостях.

Як впливає з даних таблиці 3, у хворих на ПШП вміст більшості жирних кислот, досліджених в еритроцитах, який перед дієтою був нижчим від норми, через два тижні лікування збільшився, наближаючись до неї.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. У таблиці 1 представлено характеристику низькоенергетичної фруктово-овочевої дієти, що містить близько 500 ккал енергії, тобто 5 разів менше, порівняно з прийнятими нормами харчування. Відношення вуглеводів до білків в обох дієтах харчування було подібним і становило близько 6.

У таблиці 2 наведено відсотковий вміст поліненасичених жирних кислот, досліджених у гомогенаті фруктово-овочевої дієти. Серед рослинних жирів, виявлених у раціоні, підтверджено наявність, головним чином, попередників жирних кислот серій n-6 і n-3, тобто лінолевої та альфа-лінолевої.

У таблиці 4 представлено індекси десатурації та елонгації, а також суми жирних кислот (20- і 22-вуглецевих) і коефіцієнт атерогенності (AA/EPA).

Таблиця 3 – Вміст поліненасичених жирних кислот у хворих на порфірію перед і через два тижні після дієтотерапії та в контрольній групі

Жирні кислоти серії n-6	Матеріал	Контрольна група	Порфірія	
			до дієти	після дієти
Лінолева	еритроцити	15,05±2,33	15,74±7,68	14,56±3,25
	плазма	27,24±2,13	27,12±3,38	23,80±4,26
Гамма-ліноленова	еритроцити	0,18±0,05	0,08±0,06	0,10±0,03
	плазма	0,25±0,14	0,24±0,10	0,19±0,06
Дигомогамма-ліноленова	еритроцити	1,22±0,20	0,80±0,44	0,95±0,68
	плазма	1,29±0,30	1,29±0,37	1,35±0,66
Арахідонова	еритроцити	9,71±1,26	5,84±3,90	10,09±1,14
	плазма	5,17±0,88	6,05±1,10	6,41±2,07
Докозатетраєнова	еритроцити	1,21±0,67	0,87±0,55	0,68±0,63
	плазма	0,15±0,06	0,15±0,04	0,20±0,05
Докозапентаєнова	еритроцити	0,26±0,15	0,18±0,09	0,17±0,23
	плазма	0,11±0,09	0,16±0,12	0,16±0,11
Жирні кислоти серії n-3	Матеріал	Контрольна група	Порфірія	
Альфа-ліноленова	еритроцити	0,36±0,16	0,67±0,87	0,31±0,14
	плазма	0,76±0,30	0,50±0,14	0,41±0,09
Ейкозапентаєнова	еритроцити	1,11±0,36	0,44±0,35	1,17±0,49*
	плазма	1,11±0,47	0,45±0,20	0,49±0,41
Докозапентаєнова	еритроцити	1,59±0,30	0,89±0,57	1,34±0,20
	плазма	0,52±0,17	0,68±0,66	0,39±0,13
Докозагексаєнова	еритроцити	3,47±0,90	1,92±1,37	3,90±0,89*
	плазма	2,10±0,88	1,51±0,86	1,78±1,14

Примітка. Тут і в таблиці 4: * – зміни достовірні, порівняно з показниками до дієти.

Таблиця 4 – Індекси десатурації та елонгації у хворих на порфірію до і після двотижневої низькоенергетичної дієти та в контрольній групі

Індекс	В еритроцитах			В плазмі		
	до дієти	після дієти	контроль-на група	до дієти	після дієти	контроль-на група
Сумарна активність десатураз (n-6)	0,52±0,32	0,86±0,19*	0,86±0,20	0,29±0,06	0,35±0,11	0,26±0,05
Сумарна активність десатураз (n-3)	11,18±13,58	23,95±9,66*	22,30±14,40	10,08±3,61	11,03±5,13	5,33±1,90
Індекс десатурації дельта 5 (n-6)	6,74±2,76	23,63±25,58	8,10±1,50	5,09±1,88	5,80±3,00	4,12±0,90
Індекс десатурації дельта 4 (n-6)	0,25±0,14	0,85±0,72	0,30±0,20	1,16±0,90	0,75±0,40*	0,68±0,50
Індекс десатурації дельта 4 (n-3)	2,31±0,74	2,89±0,46	2,25±0,60	3,68±1,68	4,41±1,70	4,06±0,90
Індекс елонгації DGLA (n-6)	17,53±14,41	7,56±5,54	7,16±1,70	6,59±2,75	7,91±3,01	6,83±4,02
Індекс елонгації DPA (n-3)	2,27±0,65	1,69±1,69	1,57±0,60	1,74±1,43	2,30±3,71	0,50±0,10
Сума кислот С 20, 22	10,94	18,30	18,57	10,29	10,78	11,21
Сума кислот С 20	7,08	12,21	12,04	7,79	8,25	7,57
Коефіцієнт атерогенності	13,27	8,62	8,75	13,67	13,08	4,65

Індекси сумарної активності десатураз жириних кислот в еритроцитах, вираховані для серій n-6 і n-3, були низькими до дієти та статистично достовірно збільшились після дієтотерапії. Натомість підвищені до дієти індекси елонгації дещо зменшились в результаті лікування.

Сума 20-вуглецевих кислот у еритроцитах, яка до дієти була майже у 2 рази нижчою, ніж у контрольній групі, після дієти підвищилась, досягаючи норми. Зміни тих самих параметрів, досліджених у плазмі, були менш характерними.

Отримані результати вказують на те, що у хворих на ПШП під впливом двотижневого застосування низькоенергетичної фруктово-овочевої дієти відбулися суттєві зміни профілю поліненасичених жирних кислот, головним чином в еритроцитах, тоді як у плазмі ці зміни були менш істотними.

Особливо цікавим, як нам здається, є той факт, що під впливом низькоенергетичної дієти настає диференційована метаболічна відповідь організму, тобто зниження певного параметра у випадку, якщо він був попередньо підвищеним, і підвищення – якщо він був низьким.

Після дієти спостерігали:

- підвищення попередньо зниженої активності десатураз в еритроцитах;
- зниження попередньо підвищеної активності десатурази дельта-4 в плазмі;
- збільшення кількості кислот EPA і DHA та 20- і 22-вуглецевих кислот в еритроцитах;

– зниження підвищеного коефіцієнта атерогенності (AA/EPA).

Нам не відомі причини зниження активності десатураз у хворих на ПШП. Як впливає з літератури, перший ензим на шляху змін поліненасичених жирних кислот, тобто десатураза дельта-6, є ферментом, що лімітує швидкість перетворень і його активність може знижуватись під дією різноманітних чинників, таких, як сам процес старіння, стрес, холестерин, надлишок насичених кислот або їх транс-ізомерів у дієті (маргарини), а також під впливом протизапальних ліків, інфекції та алкоголю [4]. У хворих ми спостерігали ряд таких чинників, зокрема, супровідну вірусну інфекцію HCV, надмірне вживання алкоголю чи застосування дієти, багаті на тваринні жири.

Варто звернути увагу на сам процес старіння, що пов'язаний з експресією багатьох генів. Це, можливо, спричиняє репозицію генів, які кодують десатуразу.

ВИСНОВКИ. 1. Той факт, що прості дієтичні маніпуляції спроможні повернути до норми порушену рівновагу складу жирних кислот, дозволяє по-новому подивитися на патогенез ПШП та інших хвороб і відкриває нові перспективи їх профілактики та лікування.

2. Лікування низькоенергетичною фруктово-овочевою дієтою звільняє в організмі саморегуляційні механізми, здатні повернути до норми порушений метаболізм поліненасичених жирних кислот.

Література

1. Brassi A., Avogaro A., Crepaldi C. et al. Short-term diabetic ketosis alters n-6 polyunsaturated fatty acid content in plasma phospholipids. // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 1996. – **81**. – P. 1650-653.
2. Britton R.S., Ferrali M., Magiera C.J. et al. Increased prooxidant action of hepatic cytosolic low-molecular-weight iron in experimental iron overload // Hepatology. – 1990. – **11**. – P. 1038-1043.
3. Folch J., Lees M., Sloane S.G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // J. Biol. Chem. – 1957. – **226**. – P. 497-509.
4. Horobin D.F. Gamma linolenic acid: an intermediate in essential acid metabolism with potential as an ethical pharmaceutical and as a food // Rev. Contem. Pharmacother. – 1990. – № 1. – P. 1-45.
5. Kunachowicz H., Nadolna I, Iwanow K, Przygoda B. Wartość odżywcza wybranych produktów spożywczych i typowych potraw. – Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 1999. – 250 p.

ВЛИЯНИЕ НИЗКОЭНЕРГЕТИЧЕСКОЙ ДИЕТЫ НА СОСТАВ ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В КРОВИ БОЛЬНЫХ ПОЗНЕЙ КОЖНОЙ ПОРФИРИЕЙ

Е. Донбровская

ГДАНСКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ, ПОЛЬША

Резюме

Группе из 8 пациентов с поздней кожной порфирией (ПКП) на протяжении 2-х недель была назначена низкоэнергетическая (около 500 ккал) фруктово-овощная диета. До и через 2 недели после диеты методом высокоэффективной газовой хроматографии в эритроцитах и плазме исследовано состав полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК). Активность энзимов, которые катализируют превращение жирных кислот, оценивали с помощью непрямого метода, подсчитывая отношение продуктов превращения жирных кислот к содержанию их предшественников. Наблюдали тенденцию к нормализации содержания ряда жирных кислот, а также активности ферментов, под влиянием диеты.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: поздняя кожная порфирия, полиненасыщенные жирные кислоты, низкоэнергетическая диета.

THE INFLUENCE OF A LOW ENERGY DIET ON THE BLOOD POLYUNSATURATED FATTY ACID COMPOSITION IN PORPHYRIA CUTANEA TARDA PATIENTS

E. Donbrovska

HDANSK MEDICAL ACADEMY, POLAND

Summary

The group of 8 patients with porphyria cutanea tarda (PCT) has been treated during 2 weeks with a low energy (500-kcal) vegetable-fruit diet. Before and after 2 weeks of the diet we investigated the composition of erythrocytes and plasma polyunsaturated fatty acids (PUFA) with high-resolution gas chromatography method. Activity of enzymes of PUFA metabolism has been evaluated with indirect method, calculating product/precursor ratio. Normalization tendency of fatty acids series and enzymes activity has been observed after diet.

KEY WORDS: porphyria cutanea tarda, polyunsaturated fatty acids, low energy diet.

Отримано 10.09.2001 р.

Адреса для листування: Е. Донбровська, вул. Бужинського, 8 с/15, Гданськ, 80462, Польща.

ФАРМАКОКІНЕТИКА ПІРОДАЗОЛУ ТА ПАРАЦЕТАМОЛУ ПРИ БОЛЬОВОМУ СИНДРОМІ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

О.Є. Ядловський

ІНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГІЇ ТА ТОКСИКОЛОГІЇ АМН УКРАЇНИ, КИЇВ

Було досліджено фармакокінетику нового неопіоїдного аналгетика піродазолу та парацетамолу при ентеральному шляху введення у тварин із змодельованим больовим синдромом у порівняльному аспекті. Результати показали розбіжності в динаміці зміни концентраційного рівня аналгетиків у крові на стадіях всмоктування й елімінації між щурами з больовим синдромом та контрольними тваринами.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: фармакокінетика, всмоктування, концентрація, біль.

ВСТУП. Біль – одна з найбільш розповсюджених патологій. Останні клінічні та експериментальні дані дозволяють говорити про те, що у ряді випадків він є самостійною нозологічною одиницею [4]. Тому створення та впровадження в лікарську практику нових аналгетиків і оптимізація застосування з урахуванням їх фармакокінетики є вельми актуальним завданням сучасної медицини. Біль супроводжується змінами гомеостазу організму [2]. Відомо, що ці зміни можуть діяти на фармакокінетику лікарських засобів [5, 10, 12]. Чи впливають дані зміни на фармакокінетику нового ненаркотичного аналгетика піродазолу, що не поступається за знеболювальною активністю кеторолаку? В порівняльному аспекті нами було досліджено фармакокінетику H^3 -піродазолу та H^3 -парацетамолу на щурах із змодельованим больовим синдромом.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проводили на 64 щурах-самках лінії Вістар масою тіла (200 ± 50) г. Їм моделювали периферійну мононейропатію [11]. При вивченні фармакокінетики застосовували піродазол та парацетамол, мічені за тритієм (H^3 -піродазол та H^3 -парацетамол). Під час ентерального (внутрішньошлункового) введення використовували метод радіоактивної індикації. При цьому для збереження ефективних доз до нерадіоактивного аналгетика додавали радіоактивний. Тваринам аналгетика вводили в дозах $1/10 LD_{50}$: 31,5 (піродазол) та 242,5 мг/кг © О.Є. Ядловський, 2001.

(парацетамол) у вигляді водно-спиртової емульсії (5 % – етанол, 5 % – твін-20, 90 % від кінцевого об'єму – вода дистильована). Визначали вміст радіоактивних речовин за методом [4] із використанням методичних вказівок [7]. При введенні піродазолу в щурів без больового синдрому (контроль) кров брали через 0,5, 1, 2, 4, 8, 24 та 48 год і через 1, 2, 4, 6 та 24 год у щурів із змодельованим больовим синдромом (дослід). При введенні парацетамолу в тварин без больового синдрому (контроль) кров брали через 0,25, 0,5, 1, 2, 4 та 6 год і через 0,5, 1, 2, 4 та 6 год у тварин із змодельованим больовим синдромом (дослід). Проби крові, що містили H^3 -піродазол чи H^3 -парацетамол, підлягали лужному гідролізу у 2М КОН при температурі 40 °С упродовж 24 год. Аліквоти гідролізатів нейтралізували оцтовою кислотою та вносили у віали з радіаційним сцинтилятором метилцелозолем, етанолом і через 10-12 год піддавали радіометрії на рідинному сцинтиляційному лічильнику фірми "ЛКБ-Прилади" (Швеція). Результати виражали в мкг/мл. Фармакокінетичні параметри розглядали в межах одночастинної моделі із всмоктуванням [8, 9] та за допомогою немодельних параметрів [1, 6, 9].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Результати дослідження дозволяють говорити про суттєво різний вплив больового синдрому на фармакокінетичні параметри H^3 -піродазолу та H^3 -парацетамолу. При периферійній моно-

нейропатії впродовж перших двох годин після введення H^3 -піродазолу рівень радіоактивної речовини у крові щурів мало відрізняється від такої ж величини у тварин контрольної групи (рис. 1). На фоні болювого синдрому зменшується час напівсмоктування піродазолу $T_{1/2abs}$, хоча й істотно не змінюється час досягнення максимальної концентрації в крові T_{max} . Майже у 2,75 раза збільшується час напіввиведення анальгетика з крові та у 1,76 раза – величина середнього часу утримання MRT (табл. 1). Значно зростає (у 1,82 раза) така характеристика біодоступності, як площа під фармакокінетичною кривою AUC, та знижується загальний кліренс Cl (табл. 1), що вказує на зменшення елімінації H^3 -піродазолу з організму.

Вищевказані зміни свідчать про збільшення часу перебування досліджуваного анальгетика в організмі на фоні болювого синдрому.

На відміну від H^3 -піродазолу, фармакокінетичні параметри H^3 -парацетамолу мають інші зміни. Майже у 2 рази зменшується, на фоні болю, максимальна концентрація в крові тварин, хоча час досягнення максимальної концентрації в крові істотно не змінюється (рис. 2). У 1,26 раза знижується, порівняно з контролем, час напіввиведення H^3 -парацетамолу з організму, майже у 2,22 раза зростає загальний кліренс Cl та у 2,2 раза зменшується площа під фармакокінетичною кривою AUC (табл. 1), що вказує на посилення елімінації анальгетика та/чи його метаболітів з організму.

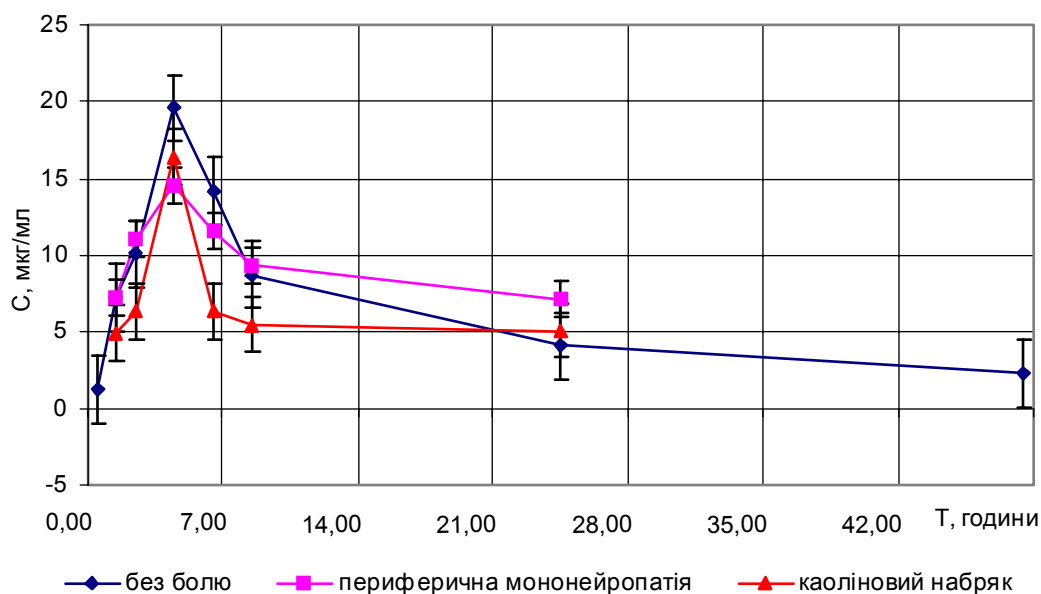


Рис. 1. Динаміка зміни концентрації H^3 -піродазолу в крові щурів з експериментальним болювим синдромом при одноразовому внутрішньошлунковому введенні в дозі 31,5 мг/кг.

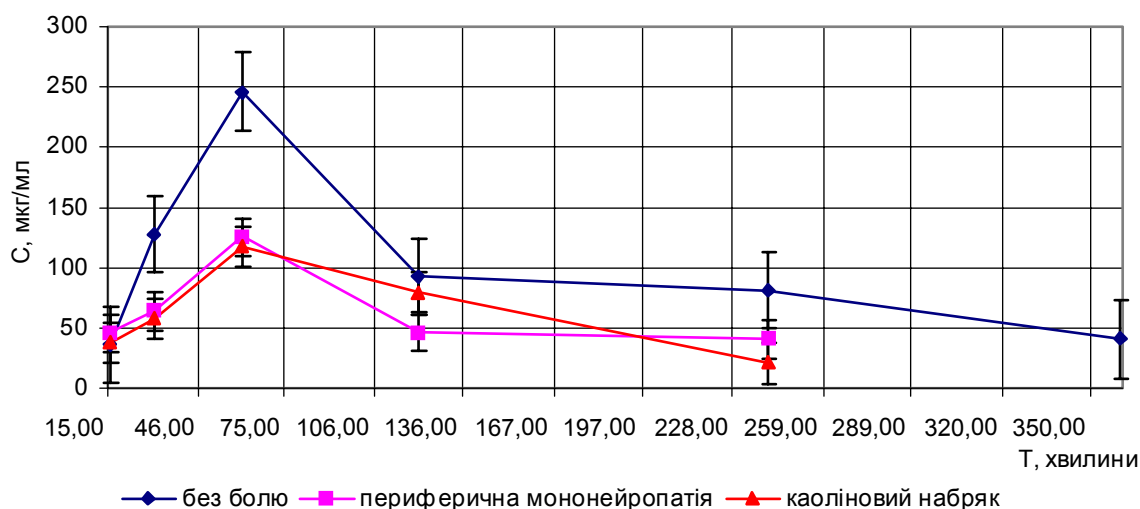


Рис. 2. Динаміка зміни концентрації H^3 -парацетамолу в крові щурів з експериментальним болювим синдромом при одноразовому внутрішньошлунковому введенні в дозі 242,5 мг/кг.

Таблиця 1 – Фармакокінетичні параметри Н³-піродазолу на Н³-парацетамолу при одноразовому внутрішньошлунковому введенні

	Піродазол		Парацетамол	
	без болю	периферійна мононейропатія	без болю	периферійна мононейропатія
Період напіввсмоктування $T_{1/2abs}$, год	1,733	0,990	0,435	0,408
Період напіввиведення $T_{1/2}$, год	6,300	17,320	1,650	1,307
Константа абсорбції K_{abs} , год ⁻¹	0,4	0,7	1,6	1,7
Константа елімінації K_{el} , год ⁻¹	0,110	0,040	0,420	0,503
Час досягнення максимальної концентрації T_{max} , год	4,452	4,437	1,133	0,996
Уявний об'єм розподілу V_d , л/кг	1,315	1,918	0,867	1,520
Кінетичний об'єм розподілу V_k , л/кг	0,362	0,113	0,227	0,474
Загальний кліренс Cl , л/(кг·год)	0,145	0,079	0,363	0,806
Уявна початкова концентрація C_0 , мкг/мл	23,955	15,897	292,800	159,559
Площа під кривою "концентрація в крові – час" AUC, (мкг·ч)/мл	217,77	397,42	664,84	301,05
Середній час утримання MRT, год	18,45	32,50	2,37	3,38

Вище наведені зміни свідчать про зниження часу перебування Н³-парацетамолу та біодоступності в організмі дослідних тварин на фоні больового синдрому периферійної мононейропатії. Різонаправлені зміни фармакокінетики Н³-піродазолу та Н³-парацетамолу на тлі болю можна пояснити різною хімічною будовою цих лікарських речовин.

Таким чином, із фармакокінетичних позицій, піродазол є більш перспективним анальгетиком, ніж парацетамол, що проявляється значним зростанням часу його перебування в організмі.

ВИСНОВКИ. 1. Больовий синдром суттєво впливає на стадії всмоктування, елімінації, розподілу Н³-піродазолу (зростають час напіввиведення $T_{1/2abs}$, середній час утримання MRT, площа під фармакокінетичною кривою AUC).

2. Біодоступність Н³-парацетамолу зменшується майже у 2 рази у тварин із больовим синдромом, переважно за рахунок нижчої концентрації у крові, зниження періоду напіввиведення, зростання кліренсу.

3. З фармакокінетичних позицій, піродазол є більш перспективним анальгетиком, ніж парацетамол.

ЛІТЕРАТУРА

1. Агафонов А.А., Пиотровский В.К. Программа M-IND оценки системных параметров фармакокинетики модельно-независимым методом статических моментов // Хим.-фарм. журн. – 1991. – № 10. – С. 16-19
2. Горизинтов П.Д. Гомеостаз. – М.: Медицина, 1981. – 576 с.
3. Жила В.А., Грачев А.В. Токсикокинетика хлорофоса в крови и мозге крыс при лечении атропином // Фармакол. и токсикол. – 1988. – № 23. – С. 88-91
4. Курт Сигизмунд. Симптом и болезнь // Pyarmmtdicum, 1995. – № 1. – С. 3.
5. Луцкевич А.Н., Бендер К.И., Решетько О.В. Изучение связи между кинетикой антипирина, содержанием серомукоида и активной ксантиоксидазы в плазме крови крыс с острым и хроническим воспалением // Экперим. и клин. фармакол. – 1995. – **58**, № 4. – С. 51-55.
6. Пиотровский В.К. Метод статических моментов и модельно независимые параметры // Фармакол. и токсикол, 1986. – № 5. – С. 118-127.
7. Приготовление образцов для измерения ак-

тивности с помощью жидкостных сцинтилляторов // Перевод УкрНИИТИ. – 1975. – № 4918. – С. 259.

8. Соловьев В.Н., Фирсов А.А., Филов В.А. Фармакокинетика. – М.: Медицина, 1980. – 423 с.

9. Фирсов А.А., Пиотровский В.К. Фармакокинетические методы в биофармации: оценка биодоступности и пресистемная элиминация лекарственных средств // Итоги науки и техники. Фармакология. Химиотерапевтические средства. – Москва, 1984. – 14. – С. 114-224.

10. Barnhart M.D., Habbell J.A., Muir W.W. et al. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and analgesic effects of morphine after rectal, intramuscular, and intravenous administration in dogs // Am. J. Vet. Res. – 2000. – **61**, № 1. – P. 24-28.

11. Jazat F., Yuilbaud Y. The "tonic" pain-related behavior seen in mononeuropathic rats in modulated by morphine and meloxon // Sci. Tech. Amin. Lab. – 1987. – **12**, № 3. – P. 217 – 226

12. Schuitmacer M., Anderson B.J., Holford N.H., Woollard G.A. Pharmacokinetics of paracetamol in adults after cardiac surgery // Anaesth. Intensive Care. – 1999. – **27**, № 6. – P. 615-622.

ФАРМАКОКИНЕТИКА ПИРОДАЗОЛА И ПАРАЦЕТАМОЛА ПРИ БОЛЕВОМ СИНДРОМЕ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

О.Е. Ядловский

ИНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГИИ И ТОКСИКОЛОГИИ АМН УКРАИНЫ, КИЕВ

Резюме

Была исследована фармакокинетика нового неопиоидного анальгетика пиродазола и парацетамола при энтеральном пути введения у животных со смоделированным болевым синдромом в сравнительном аспекте. Результаты показали различия в динамике изменения концентрационного уровня анальгетиков в крови на стадиях всасывания и элиминации между крысами с болевым синдромом и контрольными животными.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фармакокинетика, всасывание, концентрация, боль.

PHARMACOKINETICS OF PIRODAZOL AND PARACETAMOL WITH AT EXPERIMENTAL PAIN SYNDROME

O.Ye. Yadlovsky

INSTITUTE OF PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY OF ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES OF UKRAINE, KYIV

Summary

It was studied in comparative aspect pharmacokinetics of new non-opioid analgetics pirodazol and paracetamol at enteral administration to the animals with modelled pain syndrome. The results showed the difference of H^{β} -pirodazol and H^{β} -paracetamol concentration in blood essential distinctions during the absorption and elimination stages in the rat with pain syndrome and control animals.

KEY WORDS: pharmacokinetics, absorption, concentration, pain.

Отримано 27.03.2001 р.

Адреса для листування: О.Е. Ядловський, вул. Рилеєва, 28, кв. 3, 252086, Київ-86, Україна.

ВИДАВНИЦТВО "УКРМЕДКНИГА"

Передплатні видання Тернопільської державної медичної академії ім. І.Я. Горбачевського

"Медична хімія" – 22869;

"Шпитальна хірургія" – 22810;

"Вісник наукових досліджень" – 22866;

"Вісник соціальної гігієни та організації охорони здоров'я України" – 22867;

"Інфекційні хвороби" – 22868.



Наша адреса:

Видавництво "Укрмедкнига", майдан Волі, 1, м.Тернопіль, 46001
тел./факс (0352)22-80-09; тел. 22-97-29

УДК 616.832-004.2-06: 616.833.-115] – 07:616.153.96-07

**ДІАГНОСТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ БІЛКІВ
ГОСТРОЇ ФАЗИ В СИРОВАТЦІ КРОВІ ХВОРИХ НА РОЗСІЯНИЙ
СКЛЕРОЗ ІЗ ДЕБЮТОМ ЗАХВОРЮВАННЯ У ВИГЛЯДІ
РЕТРОБУЛЬБАРНОГО НЕВРИТУ****Я. Сольський¹, Т.І. Негрич², Н.Б. Сеньків²**ЛЮБЛІНСЬКА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ, ПОЛЬЩА¹ЛЬВІВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. ДАНИЛА ГАЛИЦЬКОГО²

Обстежили 12 хворих із хронічно прогресуючим типом перебігу розсіяного склерозу до і після лікування новим препаратом кладрибіном – специфічним антилімфоцитарним та антимоноцитарним імуносупресивним агентом. З метою оцінки ефективності проведеного лікування в сироватці крові хворих визначали концентрацію білків гострої фази. Встановлено, що кладрибін є ефективним препаратом у лікуванні розсіяного склерозу.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: розсіяний склероз, кладрибін, білки гострої фази.

ВСТУП. Розсіяний склероз (РС) є хронічним захворюванням центральної нервової системи (ЦНС), яке характеризується наявністю вогнищ демієлінізації з подальшим розростанням глії в білій речовині головного і спинного мозку. Етіопатогенез РС залишається нерозв'язаною проблемою в неврології, але накопичені факти дедалі більше свідчать на користь гіпотези, що він має багаточинниковий, неоднорідний і неспецифічний характер [1].

Діагностика захворювання також викликає багато труднощів. Вважають, що істотну роль у діагностиці РС може відігравати дослідження білків гострої фази. Білки гострої фази синтезуються в печінці, але експресія генів для їх синтезу спостерігається також в інших органах і тканинах, таких, як фагоцити периферійної крові, нирки, мозок, легені. Від моменту впливу зовнішнього агента через 2-5 год розпочинається синтез білків гострої фази, а через 18-24 год вони потрапляють до кровообігу. Концентрація їх зростає при різних запальних захворюваннях, інфекційних хворобах, травмах, новоутвореннях [2].

Факторами, які активують синтез білків гострої фази, є продукти розпаду пошкоджених тканин, а також цитокіни, які виділяються лімфоцитами й активуються запальним процесом.

До білків гострої фази відносять антитрипсин, кислий глікопротеїн, гаптоглобін, фібриноген, С-реактивний білок, феритин, церуло-

© Я. Сольський, Т.І. Негрич – к.м.н., Н. Сеньків, 2001.

плазмін, трансферин, компоненти С₃ і С₄ комплекменту. Фізіологічно їх концентрація зростає у вагітних і жінок, які приймають таблетовані контрацептиви.

Отаннім часом великі надії в лікуванні РС покладають на похідну деоксіденозину – кладрибін. Даний препарат є простим нуклеозидом, у якому атом водню у 2-й позиції піридинового кільця заміщений атомом хлору, що призводить до того, що він не розкладається під впливом аденінової деамінази. Кладрибін чинить вибірковий токсичний вплив на лімфоцити і, на противагу іншим хіміопрепаратам, має добру толерантність.

Побічні дії кладрибіну (переважно тромбоцитопенія та опортуністичні інфекції) пов'язують із незадовільним загальним станом пацієнтів.

Згідно з даними проведених досліджень, підтверджено значну активність препарату у хворих на лейкопенію за рахунок тривалої супресії Т-лімфоцитів.

Кладрибін виявився ефективним імуносупресивним препаратом при лікуванні хронічного лейкозу та системного червоного вовчака. Після лікування даним препаратом у хворих підвищувався гемоглобін і зникла потреба в переливанні крові. Даний ефект утримувався протягом кількох місяців.

Крім цього, слід додати, що кладрибін не порушує процесів мієлінізації в ЦНС, а також швидко надходить до спинномозкової рідини, досягаючи там концентрації, яка становить 40 % від концентрації в сироватці крові [3, 4].

Метою даної роботи стало визначення концентрації деяких білків гострої фази в сироватці крові хворих на РС перед початком лікування кладрибіном і через 6 місяців після приймання цього препарату.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Обстежили 12 хворих на РС (8 жінок та 4 чоловіків) віком від 27 до 48 років. У 5 пацієнтів діагностували спінальну форму захворювання, у 4 – змішану (1,5-7,5 балів за шкалою Куртцке). РС у всіх випадках дебютував ретробульбарним невритом, який проявлявся зниженням гостроти зору та концентричним звуженням полів зору. Перебіг РС у всіх обстежених був хронічно-прогресуючим.

Кров забирали з ліктьової вени між 9-10 годинами ранку. Рівень білків гострої фази в сироватці крові обстежених визначали імуно-турбідиметричним методом на апараті Cobas Integra, а гематологічні показники – на апараті Coulter Maxm. Перший раз кров забирали перед початком лікування кладрибіном. Лікування розпочинали, вводячи препарат підшкірно в дозі 25 мг, і повторювали кожного наступного місяця. Через 6 місяців проводили другий забір крові.

Результати проведених досліджень обробляли статистично на комп'ютері за допомогою програми "STATISTICA". Вираховували середнє арифметичне, стандартне відхилення і достовірність отриманих результатів.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. У таблиці 1 представлено рівень окремих гематологічних параметрів, які визначали в сироватці крові хворих на РС перед початком лікування кладрибіном і через 6 місяців після нього.

Як видно з таблиці 1, після прийняття препарату статистично достовірно зменшився лише рівень лімфоцитів, порівняно із значеннями до лікування. Усі інші статистичні гематологічні показники не змінилися.

У таблиці 2 представлено значення концентрації білків гострої фази в сироватці крові хворих на РС до і після лікування кладрибіном.

Як видно з таблиці 2, статистично достовірно після лікування кладрибіном змінилися лише значення компонентів C_3 та C_4 комплекменту: концентрація обох зросла.

Статистично достовірне збільшення концентрації компонентів C_3 і C_4 комплекменту, підтвержене нашими дослідженнями, може бути спричинене вибірковою впливом кладрибіну на популяцію Т-лімфоцитів. Разом із тим, не вдається припинити демієлінізуючий та запальний процеси, які мають місце при РС.

Серед інших білків гострої фази, концентрацію яких визначали в даній роботі, не підтверджено статистично достовірних змін після піврічної терапії кладрибіном.

З проведених досліджень випливає, що статистично достовірно змінився лише рівень лімфоцитів, що можна пояснити фактом здатності кладрибіну вибірково гальмувати про-

Таблиця 1 – **Значення гематологічних показників у сироватці крові хворих на РС до і після лікування кладрибіном ($M \pm m$; $n=12$)**

Показники	До лікування	Після лікування
Еритроцити, $10^{12}/л$	4,28±0,38	4,40±0,47
Гемоглобін, г/л	126,00±1,61	132,30±1,26
Гематокрит, %	38,69±4,54	38,96±4,35
Моноцити, $10^3/л$	6,79±1,49	5,83±1,84
Тромбоцити, $10^3/л$	195,67±55,06	177,22±44,95
Лімфоцити, %	28,96±6,86	12,34±5,37*

Примітка. * – $P < 0,001$, порівняно з групою хворих до лікування.

Таблиця 2 – **Концентрація білків гострої фази в сироватці крові хворих на РС до і після лікування кладрибіном, мг/дл ($M \pm m$; $n=12$)**

Показники	До лікування	Після лікування
С-реактивний білок	<4,7	<4,7
α_1 -антитрипсин	117,55±14,21	132,78±24,62
Гаптоглобін	99,89±43,84	75,44±34,21
Компонент C_3 комплекменту	85,67±9,50	115,55±19,08 *
Компонент C_4 комплекменту	16,51±5,60	21,92±6,80 **
Трансферин	226,78±34,78	227,89±32,40
Феритин	44,57±52,90	43,99±43,32

Примітка. * – $P < 0,01$, порівняно з групою хворих до лікування;

** – $P < 0,05$, порівняно з групою хворих до лікування.

ліферацію Т-лімфоцитів, впливаючи однаково на клітинну і гуморальну відповіді організму.

Спостерігалася позитивна динаміка як у неврологічному статусі хворих (зменшилася спастика в ногах, зникли патологічні рефлекси, хворі могли самостійно сидіти, ходити), так і при офтальмологічному огляді (покращилося гострота зору, розширилися поля зору).

Результати проведених нами клінічних та лабораторних досліджень можуть підтвердити ефективність кладрибіну при лікуванні РС та інших аутоімунних захворювань.

ВИСНОВКИ. 1. У сироватці крові хворих на РС після лікування кладрибіном виявлено зниження концентрації лімфоцитів порівняно із станом до лікування.

2. Виявлено статистично достовірне підвищення концентрації компонентів C_3 та C_4 комплементу в сироватці крові хворих після лікування кладрибіном.

3. Кладрибін можна рекомендувати як ефективний препарат для лікування хворих на РС із хронічно прогресуючим типом перебігу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гусев Е.И., Демина Т.Л., Бойко А.Н. Рас-
сеянный склероз. – М.: Медицина, 1997. – 463 с.

2. Angielski S., Jakubowski Z., Dominiczak M.
Biochemia kliniczna. – Gdansk, 1996. – 345 p.

3. Grieb P., Stelmasiak Z. Leczenie stwardnienia

rozszianego przy pomocy nowego immunosupresanta
kladrybiny // Neur. Neurochir. Pol. – 1995. – **29**. – P. 69-76.

4. Sipe J.S., Romine J.S., Koziol J.A. Cladribine
in treatment of chronic progressive multiple sclerosis //
Lancet. – 1994. – **344**. – P. 9-13.

ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКОВ ОСТРОЙ ФАЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАССЕЯНЫМ СКЛЕРОЗОМ С ДЕБЮТОМ ЗАБОЛЕВАНИЯ В ВИДЕ РЕТРОБУЛЬБАРНОГО НЕВРИТА

Я. Сольский¹, Т.И. Негрич², Н.Б. Сеньків²

ЛЮБЛИНСКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ, ПОЛЬША¹

ЛЬВОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. ДАНИЛА ГАЛИЦКОГО²

Резюме

Обследовали 12 больных из хронически прогрессирующим типом течения рассеянного склероза до и после лечения новым препаратом кладрибином – специфическим антилимфоцитарным и антимоноцитарным иммуносупрессивным агентом. С целью оценки эффективности проведенного лечения в сыворотке крови больных определяли концентрацию белков острой фазы. Установлено, что кладрибин является эффективным препаратом в лечении рассеянного склероза.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **рассеянный склероз, кладрибин, белки острой фазы.**

THE DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE OF ACUTE PHASE PROTEINS CONCENTRATION DETERMINATION IN BLOOD SERUM OF PATIENTS WITH MULTIPLE SCLEROSIS WITH THE DISEASE ONSET AS RETROBULBAR NEVRITIES

Ya. Solsky¹, T.I. Negrych², N.B. Senkiv²

LUBLIN MEDICAL ACADEMY, POLAND¹

LIVV STATE MEDICAL UNIVERSITY BY DANYLO HALYTSKY²

Summary

12 patients with chronically progressing type of MS before and after treatment by cladribin (specific antilymphocytar and antimonocytar immunosuppressor agent) were observed. For the evaluation of carried out treatment in blood serum of the patients the acute phase proteins were determined. It was established that cladribine is the effective drug for MS treatment.

KEY WORDS: **multiple sclerosis, cladribine, acute phase proteins**

Отримано 6.04.2001 р.

Адреса для листування: Т.І. Негрич, вул. Донцова, 11/2, 79008, Львів, Україна.

ЕФЕКТИВНІСТЬ ІНГАЛЯЦІЙНОГО ВВЕДЕННЯ ФЕНОБАРБІТАЛУ НА СИСТЕМУ ЦИТОХРОМ Р-450-ЗАЛЕЖНИХ МОНООКСИГЕНАЗ ЛЕГЕНЬ ПРИ ЇХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ХРОНІЧНОМУ НЕСПЕЦИФІЧНОМУ ЗАПАЛЬНОМУ ЗАХВОРЮВАННІ

Т.С. Саатов¹, П.С. Зуфаров², Р.І. Усманов², А.В. Якубов²
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ АКАДЕМІЇ НАУК РЕСПУБЛІКИ УЗБЕКИСТАН, ТАШКЕНТ¹
ДРУГИЙ ТАШКЕНТСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ ІНСТИТУТ²

На експериментальній моделі хронічного неспецифічного запального захворювання легень у щурів у порівняльному аспекті вивчено вплив фенобарбіталу при його пероральному й інгаляційному введенні на систему цитохром Р-450-залежних монооксигеназ легень. Установлено, що інгаляційно введений препарат у значно меншій дозі, ніж пероральна, чинить більш виражену індуктивну дію на систему цитохром Р-450-залежних монооксигеназ легень.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: хронічне неспецифічне запальне захворювання легень, монооксигеназна система легень, фенобарбітал.

ВСТУП. Відомо, що монооксигеназна ферментна система (МОФС) легень відіграє важливу роль у життєдіяльності клітин. За допомогою ферментів цієї системи відбуваються багатогранні, складні біохімічні процеси в цитоплазмі. Центральну ланку у функціонуванні даної системи займають цитохром Р-450 та його деякі ізоформи [2]. Як було встановлено, при хронічному неспецифічному запальному захворюванні легень (ХНЗЗЛ) система цитохром Р-450-залежних монооксигеназ дуже чутлива до дії різних патологічних чинників [8]. Якщо врахувати той факт, що з участю цієї системи здійснюється і синтез фосфоліпідних компонентів легеневого сурфактанта [3, 5, 12], то вивчення функціонального стану системи цитохром Р-450-залежних монооксигеназ легень при ХНЗЗЛ і впливу на цю систему лікарських засобів з індуктивними властивостями можна вважати обґрунтованим та доцільним. Відомо, що сильним індуктором МОФС є фенобарбітал. Однак широкому його застосуванню перешкоджає ряд побічних ефектів [4, 9]. Перспективним, на наш погляд, є інгаляційне введення препарату.

Як відомо, інгаляційно введений лікарський засіб потрапляє безпосередньо в респіраторну систему. Відповідно, створюються високі концентрації препарату в легенях, не підвищується

його рівень у крові, що дає можливість використовувати фенобарбітал у значно меншій дозі й запобігати появі побічних дій [6, 11].

Метою нашого дослідження було порівняльне вивчення впливу препарату при його пероральному й інгаляційному введенні на систему цитохром Р-450-залежних монооксигеназ легень при ХНЗЗЛ у щурів.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди проводили на білих статеводозрілих щурах-самцях змішаної популяції масою тіла 160-220 г. Експериментальну модель ХНЗЗЛ відтворювали методом М.А. Захар'євської та Н.Н. Анічкова (1952) в нашій модифікації [1]. Тварин поділили на 3 групи: до 1-ї ввійшли щури з ЕХНЗЗЛ, яких не лікували; до 2-ї – тварини, яким протягом 6 днів вводили всередину фенобарбітал у дозі 50 мг/кг; до 3-ї – щури, яким упродовж 6 днів інгалювали препарат у дозі 20 мг/кг 1 раз на добу за допомогою інгалятора TUR USI-50 (Німеччина). Тварин забивали шляхом одномоментної декапіталяції через 24 год після останнього введення фенобарбіталу. В мікросомальній фракції легневих гомогенатів визначали вміст цитохрому Р-450 за методом [10] та активність НАДФН-цитохром-С-редуктази за методом [13]. А в надосадковій рідині гомогенату легень – активність амідопірин-*N*-деметилази за методом [7]. Контролем були показники інтактних щурів.

© Т.С. Саатов – академік АН Республіки Узбекистан, д.б.н., проф., П.С. Зуфаров – к.м.н., Р.І. Усманов – д.м.н., проф., А.В. Якубов – д.м.н., 2001.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Результати проведених досліджень показали, що в умовах ЕХНЗЗЛ відбуваються значні зміни в показниках функціональної повноцінності системи цитохром Р-450-залежних монооксигеназ легень (табл. 1). Так, вміст основного гемопротейну цієї системи – цитохрому Р-450 – зменшується більше ніж у 2 рази. Більше ніж в 1,5 рази знижується активність НАДФН-цитохром-С-редуктази. А активність амідопірин-*N*-деметилази була в 1,5 рази меншою від показника інтактних щурів. Це свідчить про порушення реакцій цитохром Р-450-залежного метаболізму. Можливо, в умовах пригнічення

цих процесів у легеневій тканині розвиваються метаболічні зміни і зумовлені ними різні клініко-патофізіологічні прояви респіраторних порушень. Без сумніву, ці порушення посилюють перебіг захворювання і знижують ефективність терапії, яку проводять, що вимагає цілеспрямованої корекції.

Як видно з наведеної таблиці, інгаляційно введений фенобарбітал чинить індуктивну дію на систему цитохром Р-450-залежних монооксигеназ легень, особливо це проявляється відносно вмісту цитохрому Р-450 й активності НАДФН-цитохром-С-редуктази. В групі тварин, яким інгаляційно вводили фенобарбітал, від-

Таблиця 1 – Вміст і активність деяких ферментів монооксигенозної системи легень при ЕХНЗЗЛ у щурів та вплив на них індуктора фенобарбіталу при різних способах його введення

№ за/п	Групи	Цитохром Р-450, нмоль/мг білка	НАДФН-цитохром С-редуктаза, нмоль/продукта мг білка/хв	Амідопірин- <i>N</i> -деметилаза, нмоль НСОН/мг білка/хв
1	Інтактна	0,148±0,014	66,67±2,00	0,232±0,021
2	ЕХНВЗЛ	0,070±0,006*	40,70±2,29*	0,155±0,013*
3	ЕХНВЗЛ+фенобарб. вн.	0,260±0,009**	84,34±2,39**	0,336±0,017**
4	ЕХНВЗЛ+фенобарб. інг.	0,305±0,005***	96,40±2,76***	0,350±0,012**

Примітка. * – достовірно стосовно інтактної групи;

** – достовірно стосовно нелікованої групи;

*** – достовірно стосовно групи ЕХНЗЗЛ+фенобарбітал всередину.

бувалось збільшення вмісту цитохрому Р-450 на 335,7 % від показників нелікованої групи, тоді як у групі щурів, яким вводили препарат всередину, вміст ферменту зріс на 271,4 %. Аналогічний ефект індукції при інгаляційному введенні препарату спостерігали і стосовно активності НАДФН-цитохром-С-редуктази. Так, якщо перорально введений фенобарбітал підвищував активність ферменту на 107,2 %, то інгаляційно введений препарат сприяв зростанню активності НАДФН-цитохром-С-редуктази на 136,8 % відносно групи тварин, яких не лікували. Ступінь індукції амідопірин-*N*-деметилази в досліджуваних групах був майже однаковим.

Отримані нами результати доводять, що інгаляційне введення фенобарбіталу, незважаючи на значно меншу дозу, чинить більш виражену індуктивну дію на МОФС легень, ніж пероральне. Можливо, це пов'язано з тим, що при інгаляційному введенні препарату ство-

рюється вища його концентрація в легеневій тканині, тоді як перорально введений фенобарбітал у процесі розподілу в організмі більше накопичується в печінці, головному мозку, нирках, меншою мірою – в легенях [11].

Результати досліджень свідчать про те, що фенобарбітал при інгаляційному способі введення дає можливість зменшити його побічні ефекти при збереженні індуктивних властивостей на МОФС легень.

ВИСНОВКИ. 1. При ЕХНЗЗЛ у щурів значно пригнічується функціональна активність системи цитохром Р-450-залежних монооксигеназ легень, що вимагає цілеспрямованої корекції з метою збереження метаболічної і синтетичної функцій легень.

2. При інгаляційному введенні фенобарбіталу індуктивний ефект препарату перевищує його ефективність при введенні перорально.

ЛІТЕРАТУРА

1. Зуфаров П.С., Хакимов З.З. Способ моделирования хронического неспецифического воспалительного заболевания легких у крыс // Узб. биол. журн. – 1998. – № 1. – С. 8-11.

2. Каримов Х.Я., Карабанович А.К., Хакимов З.З. Патогенетическое значение монооксигеназной

системы в биотрансформации эндобиотиков. – Ташкент, 1995. – 163 с.

3. Мавлянов И.Р. Клинико-экспериментальное обоснование антинатальной профилактики синдрома дыхательных расстройств новорожденных с помощью индукторов монооксигеназ

ной системы: Дис. ... д-ра мед. наук. – Ташкент, 1993. – 290 с.

4. Наджимутдинов К.Н., Хакимов З.З., Кабулов Ш.М. О преимуществах бензола как индуктора монооксигеназной ферментной системы печени по сравнению с фенобарбиталом // Эксперим. и клин. фарм. – 1992. – **55**, вып. 1. – С. 68-71.

5. Нестеров Е.Н., Паневская Г.Н. Сурфактантная система легких и коррекция ее нарушений при бронхолегочных заболеваниях // Пульмонология. – 2000. – № 3. – С. 19-25.

6. Новое в ингаляционной терапии больных с бронхолегочными заболеваниями // Здоровоохранение Белоруссии. – 1986. – № 12. – С. 66-67.

7. Попов П. Определяне на пирамидоновата N-деметилаза в черния дроб на плъхове // Экспер. мед. – 1973. – **12**, № 3. – С. 130-135.

8. Усманов Р.И., Зуева Е.Б., Рустамов Б.Р., Якубов А.В. Особенности системы метаболизма

ЛС в легких и адаптивно-патологические изменения при поражении легких // XVI Европейская конференция по лекарственному метаболизму. – Франция, 1994. – С. 297.

9. Macdonald J.B., Macdonald E.T. Nocturnal femoral tractures and continuing widedpread use of barbiturate hyphnotios // Brit. Med. J. – 1977. – **2**. – 438 p.

10. Omura T., Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes // J. Biol. Chem. – 1964. – **39**. – P. 2370-2378.

11. Physicians' Desk Reference. PDR. Medical economy company. – 1998. – 278 p.

12. Rooney S.A. The surfactant system and lung phospholipid biochemistry // Amer. Rev. Resp. Dis. – 1985. – **131**, № 3. – P. 439-460.

13. Wilson J.T. Growth on the cytochrome P-450 // Biochem. Pharmacol. – 1973. – **22**, № 14. – P. 1717-1728.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИНГАЛЯЦИОННОГО ВВЕДЕНИЯ ФЕНОБАРБИТАЛА НА СИСТЕМУ ЦИТОХРОМ P-450-ЗАВИСИМЫХ МОНООКСИГЕНАЗ ЛЕГКИХ ПРИ ИХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ХРОНИЧЕСКОМ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОМ ВОСПАЛИТЕЛЬНОМ ЗАБОЛЕВАНИИ

Т.С. Саатов¹, П.С. Зуфаров², Р.И. Усманов², А.В. Якубов²
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ АКАДЕМИИ НАУК РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН, ТАШКЕНТ¹
ВТОРОЙ ТАШКЕНТСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИНСТИТУТ²

Резюме

На экспериментальной модели хронического неспецифического воспалительного заболевания легких у крыс в сравнительном аспекте изучено влияние фенобарбитала при его пероральном и ингаляционном введении на систему цитохром P-450-зависимых монооксигеназ легких. Установлено, что ингаляционно введенный препарат в значительно меньшей дозе, чем пероральная, оказывает более выраженный индуктивный эффект на систему цитохром P-450-зависимых монооксигеназ легких.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: хроническое неспецифическое воспалительное заболевание легких, монооксигеназная система легких, фенобарбитал.

EFFICACY OF INHALATED PHENOBARBITAL ON CYTOCHROM P-450-DEPENDENT MONOOXYGENASE SYSTEM OF LUNG AT EXPERIMENTAL CHRONIC NON-SPECIFIC INFLAMMATORY PULMONARY DISEASE

T.S. Saatov¹, P.S. Zufarov², R.I. Usmanov², A.V. Yakubov²
INSTITUTE OF BIOCHEMISTRY, ACADEMY OF SCIENCES OF REPUBLIC UZBEKISTAN, TASHKENT¹
THE SECOND TASHKENT STATE MEDICAL INSTITUTE²

Summary

There has been studied the influence of phenobarbital given per os and per inhalation on the system of cytochrom P-450-dependent monooxygenases of lung in the experimental model of chronic non-specific inflammatory pulmonary diseases in rats. It is established that phenobarbital given per inhalation in significantly less doses has more expressed effect on the system of cytochrom P-450-dependent monooxygenases of lung than phenobarbital given per os.

KEY WORDS: chronic non-specific inflammatory pulmonary disease, pulmonary monooxygenase system, phenobarbital.

Отримано 19.04.2001 р.

Адреса для листування: Т.С. Саатов, Институт биохимии АН Республики Узбекистан, просп. Х. Абдулаева, 56, Ташкент, 700143, Узбекистан; e-mail: saatov@biohim.org.uz.

ВПЛИВ МІДОКАЛМУ НА АКТИВНІСТЬ ГЛУТАТІОНОВОЇ АНТИПЕРОКСИДНОЇ СИСТЕМИ В ЛІМФОЦИТАХ КРОВІ

А.Б. Зіменковський, Н.О. Підковка, З.Д. Воробець
ЛЬВІВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. ДАНИЛА ГАЛИЦЬКОГО

Мідокалм у лімфоцитах крові інгібує активність глутатіонредуктази, при низьких концентраціях (5 мкг/мл) зумовлює незначне зростання активності глутатіонпероксидази, при вищих – її зменшення.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: мідокалм, глутатіонпероксидаза, глутатіон редуктаза, лімфоцити.

ВСТУП. На сьогодні, в клінічній практиці при неврологічних захворюваннях і патології опорно-рухового апарату широко використовуються міорелаксанти. Одним із найбільш розповсюджених серед них є мідокалм (толперизон). Незважаючи на те, що ефект мідокалму на фізіологічні функції добре вивчено, механізм його дії з'ясовано недостатньо. Виявлено, що ефект цього міорелаксанту певним чином пов'язаний із роботою іонотранспортних систем [8], є також підстава припустити, що він впливає і на ряд інших життєво важливих систем клітини.

Відомо, що основу антипероксидної системи клітин становлять глутатіонзалежні ферменти: глутатіонпероксидаза (ГП) та глутатіонредуктаза (ГР). Завдяки каталітичній активності ГП у клітинах, H_2O_2 та гідропероксиди органічних молекул відновлюються у відповідні гідрополуки [1, 7, 8]. Цей процес відбувається з використанням відновленого глутатіону (GSH). До складу цієї захисної системи також входить NADPH-залежний фермент – глутатіонредуктаза, яка забезпечує реакцію відновлення окисненої форми глутатіону (GS-SG) та, відповідно, реакціювання GSH. У зв'язку з цим, дослідження ферментів антипероксидного захисту при вивченні механізму дії препаратів, які впроваджують у медичну практику, має важливе значення для біохімії та фармакології. Метою даної роботи було дослідити зміни активності ГП та ГР при дії мідокалму в лімфоцитах крові, які забезпечують імунологічний статус організму і є зручною моделлю для вивчення метаболічних процесів.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди проводили на лімфоцитах крові людини, які отри-

© А.Б. Зіменковський – к.м.н., Н.О. Підковка, З.Д. Воробець – д.б.н., проф., 2001.

мували методом градієнтного центрифугування в розчині фікол-урографіну ($r=1,077$) [3]. В експериментах використовували препарат мідокалм (Гедеон Ріхтер, Угорщина).

Активність ГП визначали за швидкістю зниження концентрації відновленої форми глутатіону в реакції з трет-бутилгідропероксидом. Сульфгідрильну групу глутатіону визначали колориметрично за реакцією Елмана з DTNB – 5,5'-дитіо-біс(2-нітробензойною) кислотою (в цьому випадку коефіцієнт мінімального поглинання генерованого аніону 3-карбоксі-4-нітрофенілсульфіду при 412 нм становив 13,6) та виражали у мкмольях GSH/мг білка за 1 хв [4].

Глутатіонредуктазну активність визначали за зменшенням вмісту NADPH при 37° протягом 10 хв та виражали у мкмольях NADPH/мг білка за 1 хв [2].

Вміст білка визначали за методом Лоурі [6].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Активність ГП, яка поряд із H_2O_2 відновлює й ліпідні гідроперекиси, при дії низьких концентрацій мідокалму (5 мкг/мл) зростає від (132 ± 12) до (154 ± 13) мкмоль GSH/мг білка за 1 хв. Зі збільшенням концентрації цієї сполуки активність ферменту знижується, при концентрації мідокалму 50 мкг/мл вона дорівнює $(96,0 \pm 8,2)$ мкмоль GSH/мг білка за 1 хв (рис. 1).

Вплив даних концентрацій мідокалму (5-50 мг/мл) на активність ГР, яка забезпечує реакцію відновлення окисненої форми глутатіону в ході як ферментативних, так і неферментативних реакцій, мав інший характер (рис. 2). За наявності в інкубаційному середовищі 5 мкг/мл мідокалму активність ГР знижувалась від $(62,0 \pm 5,2)$ (контроль) до $(12,0 \pm 1,3)$ мкмоль GSH/мг білка за 1 хв. Із зростанням концентрації мідокалму до 50 мкг/мл вона зменшувалась практично до нуля.

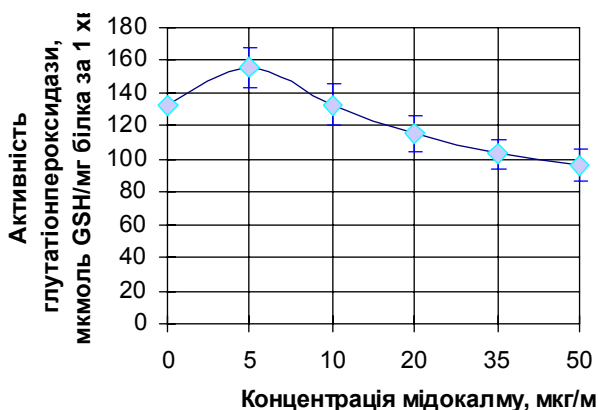


Рис. 1. Залежність активності глутатіонпероксидази від концентрації мідокалму.

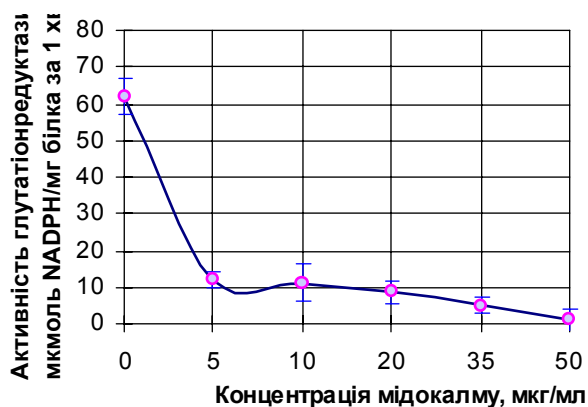


Рис. 2. Залежність активності глутатіонредуктази від концентрації мідокалму.

Оскільки функціонування ГП та ГР залежить від наявності пулу відновленого глутатіону, можна зробити висновок, що незначне зростання активності ГП при дії низьких концентрацій мідокалму (5 мкг/мл) зумовлене наявним пулом GSH. Практично повне інгібування мідокалмом активності ГР призводить до суттєвого зменшення концентрації відновленого глутатіону. Таким чином, за відсутності свого субстрату активність ГП різко знижується.

Швидкість використання та ступінь втрати антиоксидантних ресурсів, які здатні підтримувати процес ПОЛ у фізіологічно безпечних межах, є показником ступеня посилення ПОЛ [1]. Поки механізм антиоксидантного захисту ефективно функціонує, єдиним і найбільш важливим критерієм активності функціонування цієї системи є швидкість застосування антиоксидантних ресурсів.

Є дані, що мідокалм посилює оксигенацію тканин [8]. Можливо, на певному етапі інтенсифікація цього процесу спричиняє появу настільки великої кількості активних форм кисню та гідропероксидів, що після незначного тимчасового зростання активності ГП відбувається пригнічення системи антипероксидного захисту. Рівень GSSG збільшується до такого ступеня, що відбувається не реактивація ГР, а навпаки, інгібування її активності. Ймовірно, в даному випадку мідокалм є ініціатором процесів перекисного окиснення.

ВИСНОВОК. Мідокалм у низьких концентраціях (5 мкг/мл) дещо збільшує активність ГП лімфоцитів крові, але зі зростанням його концентрації цей показник зменшується. Він також зумовлює зниження активності ГР та пригнічує функціонування глутатіонової антипероксидної системи в цілому.

ЛІТЕРАТУРА

1. Барабой В.А., Сутковой Д.А. Окислительно-антиоксидантный гомеостаз в норме и патологии. – К.: Чернобыльинтеринформ, 1997. – 205 с.
2. Власова С.Н., Шабунина Е.И., Переслегина И.А. Активность глутатионзависимых ферментов эритроцитов при хронических заболеваниях печени у детей // Лаб. дело. – 1990. – № 8. – С. 19-22.
3. Клиническая иммунология / Под ред. А.В. Караулова. – М.: Медицинское информационное агентство, 1999. – 603 с.
4. Моин В.М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах // Лаб. дело. – 1986. – № 12. – С. 724-727.
5. Krinsky N.I. Membrane Antioxidants // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 1991. – **527**. – P. 17-33.
6. Lowry O., Roserbrough W., Farr A., Randall R. Protein measurement with the Folin Phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – **193**, № 1. – P. 265-279.
7. Mannervik B. Glutathione peroxidase // Meth. in enzym. – 1991. – **77**. – P. 490-495
8. Miskolczi P. Midokalm // J. Pharm. and Biomed. Analysis. – 1987. – **5**, № 7. – P. 695-700
9. Ursini F. and Bindoli A. The role of selenium peroxidases in the protection against oxidative damage of membranes // Chem. Phys. Lipid. – 1987 – **44**. – P. 255-276.

ВЛИЯНИЕ МИДОКАЛМА НА АКТИВНОСТЬ ГЛУТАТИОНОВОЙ АНТИПЕРОКСИДНОЙ СИСТЕМЫ В ЛИФОЦИТАХ КРОВИ

А.Б. Зименковский, Н.О. Подковка, З.Д. Воробец
ЛЬВОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. ДАНИЛА ГАЛИЦКОГО

Резюме

Мидокалм в лимфоцитах крови ингибирует активность глутатионредуктазы, при низких концентрациях (5 мкг/мл) обуславливает незначительное возростание активности глутатионпероксидазы, при более высоких – ее уменьшение.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: мидокалм, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, лимфоциты.

EFFECT OF MIDOKALM ON THE GLUTATHIONE ANTIPEROXIDE SYSTEM OF THE HUMAN LYMPHOCYTES

A.B. Zimenkovsky, N.O. Podkovka, Z.D. Vorobets
LVIV STATE MEDICAL UNIVERSITY BY DANYLO HALYTSKY

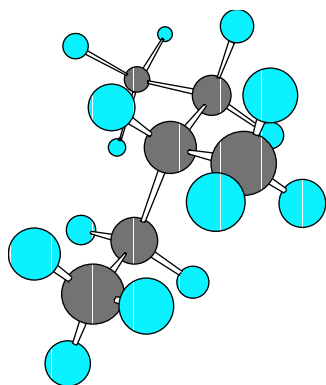
Summary

Midokalm in human lymphocytes inhibites glutathione reductase activity, activates glutathione peroxidase at low concentration (5 mkg/ml) and inhibites it at higher concentrations.

KEY WORDS: midokalm, glutathione peroxidase, glutathione reductase, limphocytes.

Отримано 10.04.2001 р.

Адреса для листування: З.Д. Воробець, вул. Пекарська, 69, 79010, м. Львів, Україна.



ВИДАВНИЦТВО “УКРМЕДКНИГА” Підручник “Біологічна хімія” Автор – член-кор. АМН України, д.м.н., проф. Губський Ю.І.

Пропонується сучасний тип підручника для вищих медичних навчальних закладів на базі багаторічного досвіду викладання на кафедрі біоорганічної та біологічної хімії Національного медичного університету ім. О.О.Богомольця.

Основа структури підручника – викладення сучасного стану питань, що стосуються будови, біологічних функцій та біосинтезу основних класів біомакромолекул – білків та нуклеїнових кислот, основ ензимології, біоенергетики, мембранології, молекулярної генетики, механізмів та взаємозв'язку обміну різних класів біомолекул, закономірностей їх регуляції фізіологічно активними сполуками – внутрішньоклітинними месенджерами та гормонами, багато з яких застосовуються в сучасній клінічній практиці як ефективні лікарські засоби нового покоління (антибіотики, інсулін, стероїди, інтерферон тощо).

Рекомендовано МОЗ України для студентів вищих медичних закладів освіти III-IV рівнів акредитації.

Об'єм підручника 600 сторінок.

**Підручник можна замовити за адресою:
Видавництво “Укрмедкнига”, майдан Волі, 1, м.Тернопіль, 46001
тел./факс (0352)22-80-09; тел. 22-97-29**

ВПЛИВ ДАЛАРГІНУ ТА ГІПЕРБАРООКСІЇ НА СТАН ГЛУТАТІОНОВОЇ СИСТЕМИ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ ЗА УМОВ ГОСТРОГО ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПЕРИТОНІТУ

А.І. Ковтун, І.Ф. Мецишен

БУКОВИНСЬКА ДЕРЖАВНА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ

Вивчено вплив гіпербарооксії та даларгину на тлі експериментального перитоніту на стан глутатіонової системи печінки щурів. Встановлено, що за умов перитоніту має місце пригнічення глутатіонової системи печінки: знижуються рівень відновленого глутатіону, активність глутатіонредуктази, глутатіонпероксидази та глутатіонтрансферази. Сумісна дія гіпербарооксії та даларгину при перитоніті активізує захисну глутатіонову систему.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **гіпербарооксія, даларгін, щури, перитоніт, глутатіонова система.**

ВСТУП. У розвитку гострого експериментального перитоніту (ГЕП) важливу патогенетичну роль відіграють активація процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) та окиснювальна модифікація білків (ОМБ).

Гіпербарооксія (ГБО) є високоефективним методом у комплексному лікуванні хворих на перитоніт [3]. Разом із тим, вона може призвести до розвитку окиснювального стресу та, як наслідок, активації ПОЛ і ОМБ. На противагу посиленому ПОЛ виступають антиоксидні системи організму, серед яких важливе місце займає глутатіонова система.

Пошук антиоксидантів (природних і синтетичних) проводять в усьому світі. У гастроентерології, гепатології, кардіології широко використовують вітчизняний синтетичний гексапептид – даларгін. Як показали експериментальні дослідження [1, 2], він проявляє виражену антиоксидну дію. Однак вплив даларгину та ГБО на стан глутатіонової системи організму за умов ГЕП не вивчався. Це і стало метою наших досліджень.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проводилися на щурах-самцях лінії Вістар масою тіла 180-200 г. Тварин поділили на 5 груп. 1-у групу (контроль) склали щури, яким внутрішньом'язово вводили 0,5 мл фізіологічного розчину натрію хлориду на 100 г маси. У тварин 2-ї, 3-ї, 4-ї, 5-ї груп викликали гострий

експериментальний перитоніт шляхом введення у черевну порожнину 0,5 мл 30 % калової зависі на 100 г маси щура. На фоні розвитку перитоніту тваринам 3-ї і 5-ї груп проводили сеанси гіпербарооксії (по одному сеансу на добу впродовж 4 днів тривалістю 60 хвилин під тиском O_2 3 атмосфери при температурі 25 °С і відносній вологості 70 %). Щурам 4-ї і 5-ї груп протягом 4 днів внутрішньом'язово вводили даларгін із розрахунку 500 мкг препарату на 1 кг маси тіла на добу (через 12 годин по 250 мкг/кг). Тварин забивали під легким ефірним наркозом на п'яту добу експерименту (пік гострого запального процесу в порожнині очеревини). У зразках тканини печінки, яку попередньо було заморожено рідким азотом, визначали вміст відновленого глутатіону, активність глутатіонредуктази (ГР), глутатіонпероксидази (ГП), глутатіонтрансферази (ГТ) і глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (Г-6-ФД) за описаними методами [5]. Одержані дані обробляли методом варіаційної статистики.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Дані таблиці 1 свідчать про те, що гострий експериментальний перитоніт спричиняє глибокі порушення стану глутатіонової системи печінки щурів: рівень відновленого глутатіону, активність ГР, ГП та ГТ зменшуються на 27,4, 24,6, 25,5 і 28,6 % відповідно, тоді як глюкозо-6-фосфатдегідрогеназна активність зростає на

© А.І. Ковтун, І.Ф. Мецишен – д.б.н., проф., 2001.

26,8 % відносно тварин контрольної групи. Отже, ГЕП супроводжується пригніченням синтезу відновленого глутатіону в печінці. Підвищення активності Г-6-ФД за умов перитоніту можна розглядати як адаптивну реакцію організму тварин, яка спрямована на підтримання рівня відновлених еквівалентів (НАДФН).

Гіпербарооксія на фоні перитоніту не впливала на вміст у печінці відновленого глутатіону (він залишався зниженим на 22 %) та активність ГР (залишалась зменшеною на 20,7 %). За цих же умов експерименту активність ГП і ГТ досягала величин контролю, а глюкозо-6-фосфатдегідрогеназна активність мала чітку тенденцію до нормалізації.

Про відсутність впливу ГБО на концентрацію відновленого глутатіону в печінці інтактних тварин повідомлялося нами раніше [4]. За таких же умов експерименту мало місце достовірне підвищення активності ГП і ГТ у печінці.

Внутрішньом'язове введення тваринам даларгіну на тлі перитоніту (табл. 1) призводило до підвищення рівня відновленого глутатіону й активності ГР (на 20,4 і 21,6 % відповідно), порівняно з перитонітом. Не виявлено впливу даларгіну на порушену при ГЕП активність ГП, ГТ та Г-6-ФД.

Поєднана дія ГБО та даларгіну на фоні ГЕП у щурів підвищувала рівень відновленого глутатіону в печінці до рівня тварин контрольної групи (табл. 1). Активність Г-6-ФД і ГР не відрізнялась від показників контролю. Що стосується активності ГП та ГТ, то вона була підвищеною як відносно перитоніту, так і контролю.

Таким чином, проведені експериментальні дослідження показали, що розвиток гострого перитоніту супроводжується істотним пригніченням глутатіонової системи захисту від активних форм кисню та продуктів ліпоперок-

сидації, накопичення яких має місце при цьому виді стресу. Такий стан в організмі сприяє розвитку глибоких порушень у ліпідному оточенні клітинних ферментів, рецепторів та іонних каналів, внаслідок чого розвивається структурна перебудова клітинних мембран, змінюється їх проникність для різних іонів, настає загибель клітин.

Вплив ГБО на стан глутатіонової системи печінки тварин спрямований на індукцію активності ГП і ГТ. Антиоксидна дія даларгіну реалізується шляхом підвищення в печінці рівня відновленого глутатіону та активності ГР. Максимальний позитивний вплив на стан глутатіонової системи на фоні експериментального перитоніту спостерігається при сумісній дії ГБО і даларгіну.

ВИСНОВКИ. 1. Гострий експериментальний перитоніт у щурів спричиняє пригнічення глутатіонової системи печінки: знижується рівень відновленого глутатіону та активність глутатіонредуктази, глутатіонпероксидази та глутатіонтрансферази.

2. Гіпербарооксія на тлі перитоніту нормалізує активність глутатіонпероксидази і глутатіонтрансферази та не впливає на вміст відновленого глутатіону й активність глутатіонредуктази.

3. Внутрішньом'язове введення тваринам даларгіну при перитоніті призводить до підвищення в печінці концентрації відновленого глутатіону, активності глутатіонредуктази і не змінює активності глутатіонпероксидази, глутатіонтрансферази та глюкозо-6-фосфатдегідрогенази.

4. Поєднана дія гіпербарооксії та даларгіну на фоні гострого експериментального перитоніту активізує глутатіонову систему печінки щурів.

Таблиця 1 – Вплив даларгіну (Д) та гіпербарооксії (ГБО) на стан глутатіонової системи печінки щурів за умов гострого експериментального перитоніту (M±m; n=7)

Умови експерименту	Показники, що вивчалися				
	Відновлений глутатіон, мкмоль/г тканини	Глутатіонредуктаза, Нмоль/хв·мг білка	Глутатіонпероксидаза, нмоль/хв·мг білка	Глутатіонтрансфераза, нмоль/хв·мг білка	Глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа, нмоль/хв·мг білка
Контроль	7,21±0,24	4,11±0,25	145,0±13,2	42,0±5,4	7,27±0,43
Перитоніт	5,24±0,22*	3,10±0,16*	108,0±10,4*	30,0±3,6*	9,22±0,52*
Перитоніт+ГБО	5,63±0,33*	3,26±0,17*	152,0±15,6#	53,0±5,2#	8,02±0,31*#
Перитоніт+ Д	6,31±0,12*#	3,77±0,16*#	121,0±9,6*	35,0±2,3*	8,82±0,34*
Перитоніт+ ГБО+Д	6,84±0,34#	4,50±0,16#	173,0±12,7*#	61,0±4,1*#	8,00±0,28#

Примітка. * – достовірні відмінності (p<0,05), порівняно з контролем;

– достовірні відмінності (p<0,05), порівняно з перитонітом.

ЛІТЕРАТУРА

1. Александрова В.А., Рычкова С.В. Даларгин – фармакологические и клинические аспекты // Педиатрия. – 1993. – № 3. – С. 101-104.
2. Боднар М.В. Эндогенные опиоидные системы и их роль в регуляции функции организма // Біль, знеболювання і інтенсивна терапія. – 1997. – № 1. – С. 39-53.
3. Васильков В.Г. Гипербарооксия и современные методы детоксикации в комплексной интенсивной терапии разлитого перитонита // Анестезиол. и реаниматол. – 1995. – № 5. – С. 23-27.
4. Ковтун А.І., Мещишен І.Ф., Давидова Н.В. Стан глутатионової системи печінки щурів за дії даларгіну та гіпербарооксії // Матеріали наук.-практ. конф. “Сучасні проблеми невідкладних станів”. – К., 2000. – С. 78-80.
5. Мещишен І.Ф. Механизм действия четвертичных аммониевых соединений (этония, тиония, додефония и их производных) на обмен веществ в норме и патологии: Автореф. дис. ... д-ра биол.наук. – К., 1991. – 37 с.

ВЛИЯНИЕ ДАЛАРГИНА И ГИПЕРБАРООКСИИ НА СОСТОЯНИЕ ГЛУТАТИОНОВОЙ СИСТЕМЫ ПЕЧЕНИ КРЫС В УСЛОВИЯХ ОСТРОГО ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПЕРИТОНИТА

А.И. Ковтун, И.Ф. Мещишен

БУКОВИНСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ

Резюме

Изучено влияние гипербарооксии и даларгина на фоне острого экспериментального перитонита на состояние глутатионової системы печени крыс. Установлено, что в условиях перитонита имеет место подавление глутатионової системы печени: снижаются уровень восстановленного глутатиона, активность глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы и глутатионтрансферазы. Сочетанное действие гипербарооксии и даларгина при перитоните активизирует защитную глутатионову систему.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гипербарооксия, даларгин, крысы, перитонит, глутатионовая система.

THE EFFECT OF DALARGIN AND HYPERBARIC OXYGENATION ON THE STATE OF THE GLUTATHIONE SYSTEM OF THE RAT HEPATIC SYSTEM UNDER CONDITIONS OF ACUTE EXPERIMENTAL PERITONITIS

A.I. Kovtun, I.F. Meshchysheh

BUKOVYNIAN STATE MEDICAL ACADEMY (CHERNIVTSI)

Summary

The effect of hyperbaric oxygenation and dalargin on the state of the glutathione system of the rat hepatic system has been studied against a background of acute experimental peritonitis. It has been established that the suppression of the hepatic glutathione system occurs under conditions of peritonitis: the level of reduced glutathione the activity of glutathione reductase, glutathione peroxidase and glutathione transferase lower. The combined action of hyperbaric oxygenation and dalargin results in the activation of the protective glutathione system under condition of peritonitis.

KEY WORDS: hyperbaric oxygenation, dalargin, rats, peritonitis, glutathione system.

Отримано 12.03.2001 р.

Адреса для листування: Мещишен І.Ф., Буковинська державна медична академія, Театральна площа, 2, 58001, Чернівці, Україна.

ДИНАМІКА РІВНІВ НИРКОВИХ ЛІЗОСОМАЛЬНИХ ГІДРОЛАЗ У ПРОЦЕСІ ЛІКУВАННЯ ХВОРИХ З ОБСТРУКЦІЄЮ СЕЧОВОДІВ КОНКРЕМЕНТАМИ

М.В. Зеляк, В.В. Дзвонковська
ІВАНО-ФРАНКІВСЬКА ДЕРЖАВНА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ

У 46 пацієнтів з частковим закупоренням одного із сечоводів камінцем протягом 7 днів – 2 місяців дослідили активність у сечі N-ацетил- β -D-глюкозамінази (НАГ) та β -галактозидази (β -ГАЛ). Величина НАГ зростала в 3 рази, а β -ГАЛ – більше ніж у 1,5 раза проти норми ($P < 0,05$). У динаміці через 3-7 місяців після оперативного усунення обструкції сечоводів обстежили 24 хворих. Нормалізацію рівнів обох гідролаз спостерігали в 17 із них. Підвищені рівні ферментурії в 7 інших, імовірно, пов'язані із загостренням хронічного пієлонефриту. Зроблено висновок, що хронічна часткова обструкція сечоводів конкрементами суттєво впливає на стан ензимурії лізосомальних гідролаз, визначення її динаміки сприяє своєчасному правильному вибору тактики лікування.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: обструкція сечоводів, камінь, лізосомальні гідролази.

ВСТУП. Серед численних урологічних захворювань динамічна або механічна обструкція сечоводів займає значне місце. Клінічна картина закупорення сечоводів дуже варіабельна й інколи безсимптомна навіть при наявності хронічної важкої перешкоди. Своєчасне розпізнавання та відповідне лікування дозволяють зберегти ниркову функцію. Тому проблема діагностики в ранній період захворювання залишається особливо актуальною. Не менш важливим є вироблення чіткого уявлення про рівень і причину обструкції сечоводів, ступінь функціонально-структурних змін у заблокованій нирці та верхніх сечових шляхах. У комплексному обстеженні хворих з обструкцією сечоводів застосували фактично весь діагностичний арсенал сучасної урології, проте “золотого стандарту” оцінки обструктивної нефропатії не існує [6]. Різні методи дослідження мають неоднакову клінічну значущість: одні з них дозволяють запідозрити обструктивний процес у сечоводах, інші – безперечно встановити діагноз, треті – уточнити локалізацію та природу обструктивного ураження, важкість порушення уродинаміки, структури та функції нирок, сечових шляхів. Основний принцип обстеження хворих – швидке одержання всієї необхідної інформації при мінімальній інвазивності діагностичних процедур [3].

© М.В. Зеляк – д.м.н., В.В. Дзвонковська – д.м.н., 2001.

Найчастіше причиною закупорення сечоводів є сечові конкременти. Відмічено часте самостійне відходження каменів розміром до 5 мм. Однак чинники, які впливають на просування конкремента по сечоводу, до цього часу викликають полеміку. Протягом останніх років лікування хворих із цією патологією зазнало значних змін [2, 7, 8].

Метою дослідження було встановлення інформативності ферментурії лізосомальних гідролаз при неінвазивній діагностиці часткової обструкції сечоводів конкрементами.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Протягом 7 днів – 2-х місяців проведено комплексне обстеження та лікування 46 хворих віком 23-54 роки (25 жінок і 21 чоловік) із частковим закупоренням одного сечовода каменем. За описаними методиками в них дослідили активність N-ацетил- β -D-глюкозамінази (НАГ) та β -галактозидази (β -ГАЛ) [4, 5]. Активність ензимів сечі виражали як у відносних одиницях (у мкмольях – π -нітрофенолу, що утворився на 1 ммоль креатиніну протягом 1 години інкубації), так і в абсолютних (у нмольях π -нітрофенолу, що утворився на 1 ммоль креатиніну протягом 1 секунди в 1 літрі біологічної рідини). Як контроль використали показники 12 практично здорових осіб віком 15-46 років.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Величини активностей НАГ та β -ГАЛ в осіб контрольної групи склали, відповідно (28,68+1,56) абс. од., (11,97+1,32) відн. од. та (24,0+1,82) абс. од., (10,17+1,35) відн. од. У сечі більшості досліджених хворих із сечовідним закупоренням (37) виявлено підвищення активності досліджених ферментів. Так, величина НАГ у міхуровій сечі зростала майже в 3 рази ((33,82+0,92) відн. од.; $P < 0,001$), а β -ГАЛ – більше ніж у 1,5 раза проти норми ((15,89+0,39) відн. од.; $P < 0,05$). Цим хворим проводили більш активне оперативне лікування.

У 16 з 46 пацієнтів додатково дослідили активність лізосомальних ферментів сечі, отриманої з ниркової миски під час операції. У них виявили достовірно значно більше зростання активності обох ферментів: рівень НАГ підвищився більше ніж у 14 разів ((171,29+14,8) відн. од.; $P < 0,001$), а β -ГАЛ – майже в 5 разів ((43,45+4,28) відн. од.; $P < 0,0001$), що узгоджується з даними інших дослідників [1, 4, 6].

У динаміці через 3-7 місяців після оперативного усунення обструкції сечоводів обстежили 24 пацієнтів. У всіх них спостерігали покращання самопочуття, аналізів крові й сечі. Оцінка результатів дослідження ферментурії показала нормалізацію рівнів обох гідролаз у 17 з 24 хворих. У 7 інших повної нормалізації не спостерігали, ймовірно, через загострення пієлонефриту в ранній післяопераційний період. У цілому в цій групі виявлено достовірне зниження рівня НАГ ((19,18+0,64) відн. од.; $P < 0,05$) та нормалізацію величини β -ГАЛ ((8,23+0,09) відн. од.; $P < 0,05$).

Усі ферменти нирок чутливі до гіпоксії, реакція каналцевого апарату нефрону на іше-

мію найбільш рання. Серед ферментних систем каналцевого епітелію найбільше діагностичне значення має дослідження в сечі активності НАГ, β -ГАЛ і деяких інших. Активність НАГ та β -ГАЛ локалізована в лізосомах. Ці субклітинні структури оточені одношаровою ліпідною мембраною і містять у латентному стані понад 30 гідролітичних ферментів. В умовах ішемії перш за все відбувається активація гідролітичних ферментів саме в лізосомах. Відповідно до функції лізосом їх ферменти виділяються у позаклітинний простір (сечу) без порушення цілісності плазматичної мембрани епітеліальної клітини шляхом внутрішньоклітинної секреції й екзоцитозу. Мікрофлора сечі не сприяє підвищенню активності лізосомальних гідролаз навіть за умови значної бактеріурії. Так само при лейкоцит- або еритроцитурії їх активність у сечі не підвищується. Не виявлено достовірної відмінності НАГ сечі між чоловіками та жінками залежно від віку [1, 4, 5, 6].

Таким чином, наведені дані дозволяють рекомендувати дослідження активності лізосомальних гідролаз як скринінг-тест для діагностики ураження нирок при частковій обструкції сечоводів конкрементами і раціонального вибору тактики лікування.

ВИСНОВКИ. 1. Хронічна часткова обструкція сечоводів конкрементами суттєво впливає на стан ензимурії лізосомальних гідролаз.

2. Визначення динаміки ферментурії лізосомальних гідролаз, як чутливих маркерів ураження нирок, при частковій обструкції сечоводів конкрементами сприяє своєчасному правильному вибору тактики лікування.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бабаева Н.И., Липицкая И.Я., Творогова М.Г., Титов В.Н. Диагностическое значение исследования активности N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы в моче // Лаб. дело. – 1991. – № 1. – С. 9-16.
2. Возіанов О.Ф., Дзюрак В.С., Черненко В.В. та ін. Екстракорпоральна літотрипсія в комбінованому лікуванні сечокам'яної хвороби // Праці VII Пленуму наук. тов-ва урологів України. – К., 1993. – С. 101-108.
3. Зеляк М.В. Клінічна і функціонально-морфологічна характеристика нирок та верхніх сечових шляхів при обструкції сечоводів: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – К., 1997. – 32 с.
4. Лавренова Т.П. Определение активности ферментов мочи при поражениях почек // Лаб. дело. – 1986. – № 7. – С. 430-432.
5. Покровский А.А., Кравченко Л.В., Тутельян В.А. Исследование активности ферментов лизосом при действии афлотоксина и митомицина С // Биохимия. – 1971. – **36**, № 4. – С. 690-696.
6. Carr M.C., Peters C.A., Retik A.B., Mandell J. Urinary levels of the renal tubular enzyme N-acetyl- β -D-glucosaminidase in unilateral obstructive uropathy // J. Urol. – 1994. – **151**, № 2. – P. 442-445.
7. Hubner W.A., Irby P., Stoller M.L. Natural history and current concepts for the treatment of small ureteral calculi // Europ. Urol. – 1993. – **24**, № 2. – P. 172-176.
8. Robert M., Drianno N., Gutter J. et al. Childhood urolithiasis: urological management of upper tract calculi in the era of extracorporeal shock – wave lithotripsy // Urol. Int. – 1996. – **57**, № 2. – P. 72-77.

ДИНАМИКА УРОВНЕЙ ПОЧЕЧНЫХ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ГИДРОЛАЗ В ПРОЦЕССЕ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ С ОБСТРУКЦИЕЙ МОЧЕТОЧНИКОВ КОНКРЕМЕНТАМИ

Н.В. Зеляк, В.В. Дзвонковская
ИВАНО-ФРАНКОВСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ

Резюме

У 46 пациентов с частичной закупоркой одного мочеточника камнем на протяжении 7 дней – 2 месяцев исследовали активность в моче N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы (НАГ) и β-галактозидазы (β-ГАЛ). Величина НАГ возростала почти в 3 раза, а β-ГАЛ – больше чем в 1,5 раза против нормы ($P < 0,05$). В динамике через 3-7 месяцев после оперативного устранения обструкции мочеточников обследовали 24 больных. Нормализацию уровней обеих гидролаз наблюдали у 17 из них. Повышенные уровни ферментурии у 7 остальных, вероятно, связаны с обострением хронического пиелонефрита. Сделан вывод, что хроническая частичная обструкция мочеточников конкрементами существенно влияет на состояние энзимурии лизосомальных гидролаз, определение ее динамики способствует своевременному правильному выбору тактики лечения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **обструкция мочеточников, камень, лизосомальные гидролазы.**

DYNAMICS OF THE LEVELS OF RENAL LIZOSOME ENZYMES DURING THE TREATMENT OF THE PATIENTS WITH URETERAL OBSTRUCTION BY A CONCREMENTS

N.V. Zelyak, V.V. Dzvонkovska
IVANO-FRANKIVSK STATE MEDICAL ACADEMY

Summary

46 patients with unilateral partial ureteral obstruction for 7 days – 2 months were studied for urine reaction of N-acetyl-β-D-glucosaminidase (NAG) and β-galactosidase (β-GAL). The NAG level increased almost three times and β-GAL more than one and a half times compared with the norm ($p < 0.05$). 24 patients were studied in dynamics for 3-7 months after the surgical intervention. Normalization of the both enzyme levels was observed in 17 of them. An increase in the fermenturia level in the remaining 7 patients was probably associated with an exacerbation of chronic pyelonephritis.

It was concluded that a partial ureteral obstruction by concrements markedly affects the lysosomal enzymes condition and the determination of its dynamics facilitates a timely proper choice of the therapeutic tactics.

KEY WORDS: **ureteral obstruction, concrement, lizosome enzymes.**

Отримано 29.05.2001 р.

Адреса для листування: М.В. Зеляк, вул. Шевченка, 44, кв. 7, 76000, Івано-Франківськ, Україна.

Для отримання оперативної інформації звертайтеся до
нашої сторінки в Інтернеті:
<http://www.tdma.ssft.ternopil.ua/journals>

ВПЛИВ РОЗВАНТАЖУВАЛЬНО-ДІЄТИЧНОЇ ТЕРАПІЇ НА ОКСИДНОВАЛЬНІ ПРОЦЕСИ ТА СИНДРОМ ЕНДОГЕННОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ У ХВОРИХ НА ІШЕМІЧНУ ХВОРОБУ СЕРЦЯ

П.П. Кузів, Ю.І. Сливка, Н.В. Банадига

ТЕРНОПІЛЬСЬКА ДЕРЖАВНА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ ІМ. І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО

Вивчено ефективність розвантажувально-дієтичної терапії у хворих на ІХС за даними перекисного окиснення ліпідів, антиоксидного захисту, вмісту хімічних елементів в еритроцитах та показниками ендогенної інтоксикації. Установлено, що проведене лікування у хворих на ІХС, позитивно впливає на стан перекисного окиснення ліпідів та антиоксидного захисту, всміст хімічних елементів у еритроцитах, забезпечує виражений детоксикаційний ефект, що свідчить про патогенетичну обґрунтованість використання цього методу лікування.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: розвантажувально-дієтична терапія, ішемічна хвороба серця, перекисне окиснення ліпідів, ендогенна інтоксикація, хімічні елементи.

ВСТУП. Останніми роками розвантажувально-дієтична терапія (РДТ) знайшла своє місце в лікуванні ІХС [3]. Ми вивчали вплив РДТ на перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ), антиоксидну систему (АОС), показники ендогенної інтоксикації (ЕІ) та вміст хімічних елементів, що допоможе оцінити деякі патогенетичні лікувальні аспекти цього методу у хворих на ІХС.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліджували 36 хворих на ІХС (стабільна стенокардія напруження, I-III функціональний клас), лікованих методом РДТ [5]. Стан ПОЛ, АОС та рівень ЕІ оцінювали за вмістом малонового діальдегіду (МДА) [7], сульфгідрильних груп (GSH) [11], церулоплазміну (ЦП) [2], активністю каталази [4] і супероксиддисмутази (СОД) [9], а також вмістом середньомолекулярних пептидів (СМП₂₅₄ і СМП₂₈₀) [1] та еритроцитарним показником (ЕП) ЕІ [8] в сироватці крові. Вмісту хімічних елементів в еритроцитах вивчали у 21 хворого віком 38-65 років. Дослідження проводили методом атомно-абсорбційної спектрофотометрії [10]. Контрольну групу склали 30 здорових людей. Дослідження проводили до початку лікування, після закінчення розвантажувального і відновного періодів. Результати опрацьовували методом варіаційної статистики.

© П.П. Кузів – д.м.н., проф., Ю.І. Сливка – к.м.н., Н.В. Банадига – д.м.н., 2001.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Отримані результати наведено в таблиці 1. У групі хворих на ІХС, порівняно з контролем, підвищувався рівень продуктів ПОЛ і знижувалися показники АОС. Рівень ЕІ характеризувався збільшенням вмісту СМП₂₅₄, СМП₂₈₀ та ЕПЕІ. Наявність хронічної недостатності кровообігу у хворих зумовлювало більш виражене накопичення продуктів ПОЛ, нижчі концентрації GSH і активність СОД.

РДТ супроводжувалася такою динамікою показників. Розвантажувальний період характеризувався збільшенням вмісту МДА на 29,5 %, вмісту GSH – на 41,1 %, зростанням активності СОД на 25,2 %. У кінці відновного періоду вміст МДА зменшувався до контрольних цифр. З показників, що характеризують АОС, лише вміст ЦП був на 11,7 % меншим від нормальних показників. Динаміка показників ЕІ була такою: збільшувався вміст СМП₂₅₄ (на 50,6 %) та ЕПЕІ (на 28,7 %) у розвантажувальний період і відбувалася їх нормалізація до кінця лікування.

До початку лікування хворі на ІХС, порівняно з контрольною групою, характеризувалися підвищеним вмістом в еритроцитах кальцію (на 34 %), тенденцією до зниження рівня магнію і зростанням співвідношення кальцій/магній на 54 %, що свідчить про підвищення судинного тонуусу в цій групі хворих. Разом із тим, спостерігалася тенденція до зменшення вмісту заліза та цинку, а також достовірне зниження рівня міді (на 18 %). Після закінчення курсу РДТ

концентрація магнію і кальцію не відрізнялася від контрольних величин. Як наслідок, співвідношення кальцій/магній нормалізувалося. На час закінчення РДТ, порівняно з контрольними

цифрами, залишалася тенденція до зниження вмісту міді, цинку та заліза. Отже, РДТ позитивно впливала на вміст хімічних елементів в еритроцитах хворих на ІХС (табл. 2).

Таблиця 1 – Динаміка показників ПОЛ, АОС та ЕІ у хворих на ІХС, лікованих методом РДТ (M±m; n=27)

Показники	Контроль	До лікування	У кінці розвантажувального періоду	У кінці лікування
СОД, % блокування	11,080±0,210	8,162±0,144*	10,248±0,384°	10,439±0,410
ЦП, мг/л	198,60±5,31	159,20±11,03*	174,59±9,64	176,11±8,49*
Каталаза, мкат/л	17,48±2,87	14,02±1,06	16,54±1,32	18,59±0,82°
Глутатіон-SH, мкмоль/л	0,980±0,003	0,641±0,023*	1,027±0,093°	1,011±0,077°
МДА, ммоль/л	2,120±0,050	3,356±0,139*	4,359±0,130*°	2,511±0,135*
СМП ₂₅₄ , ум. од	193,88±5,00	219,37±12,84	336,14±15,39*	198,51±13,25
СМП ₂₈₀ , ум. од	138,89±5,00	155,29±9,30	186,01±18,10*	145,11±6,82
ЕПЕІ, %	0,310±0,002	0,399±0,017*	0,510±0,028*°	0,337±0,015°

Пимітка. * - різниця достовірна, порівняно з контролем;

° - різниця достовірна, порівняно з показниками до лікування.

Таблиця 2 – Вміст кальцію, магнію, міді, цинку та заліза в еритроцитах хворих на ІХС при проведенні РДТ (M±m)

	Кальцій, г на 100 г попелу	Магній, г на 100 г попелу	Співвідношення кальцій/магній	Мідь, мг на 100 г попелу	Цинк, мг на 100 г попелу	Залізо, г на 100 г попелу
Контроль (n=30)	12,99±0,68	4,20±0,16	3,10±0,21	50,43±2,64	99,40±5,02	6,18±0,44
ІХС, до лікування (n=21)	17,48±0,83*	3,64±0,24	4,79±0,42*	41,53±1,80*	95,61±2,51	6,00±0,35
ІХС, після лікування (n=21)	14,42±0,69	4,18±0,18	3,49±0,24	46,42±3,82	94,70±3,92	5,85±0,24

Примітка. * - різниця достовірна, порівняно з контролем.

При ІХС, як наслідок гіпоксії тканин, порушується обмін хімічних елементів, посилюється ПОЛ, пошкоджується антиоксидний захист, погіршується стан тканинного дихання, активується анаеробний гліколітичний тип дихання, руйнуються клітинні мембрани. З іонами металів тісно пов'язана активність металовмісних ферментів, що регулюють рівень вільних радикалів, перекисів ліпідів, продуктів вільнорадикального окиснення - каталази (мідь, залізо), глутатіонпероксидази (залізо, селен),

супероксиддисмутази (цинк) [10]. Позитивний вплив РДТ на стан ПОЛ, антиоксидного захисту та вміст хімічних елементів у тканинах хворих на ІХС свідчить про дієвість проведеної терапії.

ВИСНОВОК. Проведення РДТ хворими на ІХС позитивно впливає на ПОЛ, АОС, вміст хімічних елементів в еритроцитах, забезпечує виражений дезінтоксикаційний ефект, що свідчить про патогенетичну обґрунтованість використання цього методу лікування.

ЛІТЕРАТУРА

1. Киреев С.С., Бекмут Т.А., Курочкін М.Ю. Визначення важкості ендотоксикозу при критичних станах у дітей // Педіатрія. – 1990. - № 6. - С. 107-109.
2. Колб В.Р., Камышников В.С. Определение церулоплазмينا в сыворотке крови модифицированным методом Ревина // В кн.: Клиническая биохимия. - Минск: Беларусь, 1976. - С. 219-220.

3. Королюк М.А., Иванова Л. И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. - 1988. - № 1. - С. 35-38.
4. Кузів П.П., Радецька Л.В., Сливка Ю.І. Ефективність розвантажувально-дієтичної терапії у хворих на ішемічну хворобу серця // Галицький лікар. вісн. - 2000. - № 1. - С. 35-37.

5. Орлов Ю.М., Кузив П.П. Методы обучения управлению пищевым влечением и пищевым поведением для повышения эффективности разгрузочно-диетической терапии (РДТ) у гастроэнтерологических больных. – Москва-Тернополь, 1988. – 54 с.

6. Дмитриев М.Т., Грановский Э.И., Шафран Л.М и др. Спектрохимическое определение тяжелых металлов в объектах окружающей среды, полимерах и биологическом материале: Метод. рекомендации. – Одесса, 1986. – 32 с.

7. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобартитуровой кислоты // В кн.: Современные методы в биохимии. - М.: Медицина, 1977. - С. 66-68.

8. Тогабаев А. А., Кургузкин А. В., Рикун И. В. Способ диагностики эндогенной интоксикации // Лаб. дело. - 1988. - № 9. - С. 22-24.

9. Чевари С., Чаба И., Секей И. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах // Лаб. дело. - 1985. - № 11. - С. 678-681.

10. Харченко Н. А. Изменение концентрации некоторых микроэлементов в крови у пациентов с ишемической болезнью сердца и у лиц с дислиппротеинемией // Укр. кардіол. журн. - 1998. - № 12. - С. 30-32.

11. Ellman G.I. Tissue sulfhydryl groups // Arch. Biochem. Biophys. - 1959. - № 5. - P. 70-77.

ВЛИЯНИЕ РАЗГРУЗОЧНО-ДИЕТИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ НА ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ И СИНДРОМ ЭНДОГЕННОЙ ИНТОКСИКАЦИИ У БОЛЬНЫХ НА ИШЕМИЧЕСКУЮ БОЛЕЗНЬ СЕРДЦА

П.П. Кузив, Ю.И. Сливка, Н.В. Банадыга

ТЕРНОПОЛЬСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ ИМ. И.Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

Реферат

Изучено эффективность разгрузочно-диетической терапии у больных на ИХС по показателям перекисного окисления липидов, антиоксидантной защиты, содержания химических элементов в эритроцитах и показателям эндогенной интоксикации. Установлено, что проведенное лечение у больных на ИБС положительно влияет на состояние перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты, содержание химических элементов в эритроцитах, обеспечивает выраженный детоксикационный эффект, что свидетельствует о патогенетической целесообразности использования этого метода лечения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: разгрузочно-диетическая терапия, ишемическая болезнь сердца, перекисное окисление липидов, эндогенная интоксикация, химические элементы.

THE EFFECT OF LONG TERM FASTING ON OXIDATIVE PROCESSES AND ENDOGENOUS INTOXICATION IN PATIENTS WITH CORONARY HEART DISEASE

P.P. Kuziv, Yu.I. Slyvka, N.V. Banadyha

TERNOPIL STATE MEDICAL ACADEMY NAMED BY I.YA. HORBACHEVSKY

Summary

The effect of long-term fasting in patients with coronary vascular disease on lipid peroxidation, antioxidant protection, chemical elements content in erythrocytes and indices of endogenous intoxication has been studied. Such treatment was established to effect positively on lipid peroxidation, antioxidant protection, chemical elements content in erythrocytes and indices of endogenous intoxication. It means that this method of treatment is useful in coronary vascular disease patients.

KEY WORDS: long-term fasting, coronary vascular disease, lipid peroxidation, endogenous intoxication, chemical elements.

Отримано 19.07.2001 р.

Адреса для листування: Ю.І. Сливка, кафедра шпитальної терапії № 1, Тернопільська державна медична академія ім. І.Я. Горбачевського, майдан Волі, 1, Тернопіль, 46001, Україна.

ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ГОМОЦИСТЕЇНУ В БІОЛОГІЧНИХ РІДИНАХ МЕТОДОМ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

О.О. Пентюк, О.В. Ільченко, С.В. Шевчук, І.І. Андрушко, О.П. Данченко
ВІННИЦЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. М.І. ПИРОГОВА

Наведено порівняльний аналіз апаратури та реагентів, які застосовують при визначенні концентрації гомоцистеїну в біологічних рідинах методом вискоєфективної рідинної хроматографії.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: гомоцистеїн, вискоєфективна рідинна хроматографія, ішемія, інфаркт міокарда.

Той факт, що концентрація гомоцистеїну в крові є важливим та незалежним маркером ризику появи серцево-судинних захворювань, уже став загальновідомим. Визначення концентрації гомоцистеїну також дозволяє виявити дефіцит фолатів та вітаміну B_{12} .

Існує велика кількість методів визначення концентрації гомоцистеїну в крові, однак питання полягає у виборі найбільш придатного для конкретних умов. Найчастіше загальну кількість гомоцистеїну визначають методами вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), які є найлегшими для автоматизації.

Слід вказати, що в клінічній біохімії вираз "рівень гомоцистеїну", або "рівень загальної кількості гомоцистеїну", відносно біологічних зразків типу плазми завжди належить до суми концентрацій усього пулу гомоцистеїну та включає як вільний, так і зв'язаний по дисульфідних містках.

Нижню межу концентрацій для гомоцистеїну практично не визначено і значення концентрацій нижче середніх меж не досліджено. Можливо, низькі концентрації гомоцистеїну не мають жодних клінічних проявів. Тому аналітична чутливість методу не є проблемою. Найнижча концентрація, що визначається тим або іншим методом, повинна приблизно дорівнювати 2 мкмоль/л, причому всі методи, які обговорено нижче, цього досягають.

Визначення концентрації тіолів у сироватці (плазмі) крові є непростим завданням, що зумовлено низкою обставин.

По-перше, речовини, що досліджуються, є сильними відновниками і присутні в організмі

© О.О. Пентюк – д.м.н., проф., О.В. Ільченко – к.х.н., С.В. Шевчук, І.І. Андрушко, О.П. Данченко, 2001.

у вигляді окислених похідних: дисульфідів, білкових кон'югатів тощо. Це вимагає попереднього їх відновлення. Але відновлені форми (тіоли) знову швидко окиснюються. За [31], втрата 75 % доданого до сироватки GSH спостерігається за 30 хв та пояснюється формуванням дисульфідів GSSG (24 %) та CSSG (74 %). Такі ж зміни відбуваються і стосовно інших типів тіолів, які додають до плазми.

По-друге, базальні концентрації гомоцистеїну досить низькі. За [23], концентрація вільного гомоцистеїну в плазмі дорівнює 1,57 мкмоль/л, що становить 10-15 % від середньої повної концентрації гомоцистеїну.

По-третє, речовини типу цистеїну, гомоцистеїну слабо поглинають випромінювання у середньому та ближньому ультрафіолеті, що ускладнює їх безпосереднє оптичне визначення й спонукає дослідника проводити перед- або післяколонкову дериватизацію – прививання флуоресцентної мітки або функціональної групи, яка має оптичну активність.

Можливе пряме визначення в дальньому ультрафіолеті [29] при 190 нм. При цьому не треба проводити дериватизацію та відновлення окислених форм. Але такий метод потребує дорогих надчистих реагентів та є достатньо трудомістким. Крім того, його чутливість не перевищує чутливості спектрофотометричних методів, що ґрунтується на одержанні оптично активних похідних.

З іншого боку, в справі визначення концентрації гомоцистеїну є і позитивні моменти. Виявлено [55], що міжіндивідуальні розбіжності в рівнях гомоцистеїну є досить великими, але протягом місяця для кожного індивідуума концентрація гомоцистеїну залишається практич-

но незмінною (коефіцієнт надійності (R) становить 0,94). Довготривалий (30 місяців) коефіцієнт надійності, який знаходиться під значним зовнішнім впливом, дорівнює 0,65, однак виключення зовнішнього впливу дало значення 0,82. Тому вважають, що концентрація плазмового гомоцистеїну є відносною константою, незмінною протягом не менше 1 місяця, і що єдине визначення досить добре характеризує середню концентрацію. За деяких умов достатню діагностичну точність має й одичне визначення через 30 місяців.

Практично в усіх роботах концентрації гомоцистеїну визначали в плазмі. В цереброспинальній рідині вони приблизно дорівнюють або нижчі звичайної межі чутливості (0,2 мкмоль/л) [51], й нам відома лише одна праця [48], де повідомляється про високу концентрацію гомоцистеїну в цереброспинальній рідині 11 пацієнтів з фіброміалгією або хронічним синдромом втоми (0,61 мкмоль/л), порівняно з контролем (0,13 мкмоль/л). Але навіть ці високі концентрації на порядок нижче середніх концентрацій гомоцистеїну в плазмі.

Практично не проводять визначення концентрації гомоцистеїну в сечі, тому що він майже повністю реабсорбується в нирках.

Типова обробка

Стандартизація процедур пробопідготовки при визначенні концентрації гомоцистеїну, порівняно з такою для, наприклад, холестерину, практично відсутня.

Вибір протикоагуляційного засобу залежить від подальшого ходу аналізу, але більшість методів базуються на стабілізації стандартними концентраціями ЕДТА або гепарину. Помірний гемоліз не впливає на концентрацію гомоцистеїну в плазмі [19].

Після відбору крові її клітини продукують гомоцистеїн та вивільняють його в плазму, що призводить до збільшення концентрації гомоцистеїну в плазмі при кімнатній температурі приблизно на 10 % за годину [3, 56]. Це є основною причиною того, чому не слід визначати концентрацію гомоцистеїну в сироватці: вона підвищиться на 5-10 % за проміжок часу, потрібний для завершення коагуляції перед центрифугуванням.

Абсолютне збільшення концентрації не залежить від концентрації гомоцистеїну в плазмі [20], тому неоптимальна обробка зразка призводить до зменшення різниці між зразками з високою та низькою концентраціями гомоцистеїну [47].

Якщо нагальне центрифугування стабілізованої крові провести неможливо, мінімізують підвищення концентрації гомоцистеїну збері-

ганням крові на льоду з відокремленням плазми за проміжок часу, що не перевищує 1 год [3]. Якщо і це зробити неможливо, кров збирають у гепаринізовані пробірки, що містять від 2 до 4 мг фториду натрію на 1 мл крові, – це запобігає суттєвому збільшенню концентрації гомоцистеїну терміном до 2 годин [39].

Багатообіцяючою альтернативою є застосування 3-деазоаденозину, специфічного інгібітора перетворення 5-аденозилгомоцистеїну в гомоцистеїн [2]. Оскільки 3-деазоаденозин інгібує початкове перетворення гомоцистеїну в 5'-аденозилгомоцистеїн в імуоферментних методах, дану добавку не можна використовувати із зразками для цих наборів [58].

Умови зберігання

Після відокремлення плазми від клітин гомоцистеїн стабільний щонайменше протягом 4 днів при кімнатній температурі [20], що дозволяє транспортування незаморожених зразків лабораторії. Крім того, він стійкий кілька тижнів при 0-2 °С [54], а в замороженому стані – при температурі -20 °С упродовж кількох місяців, а, можливо, і років [8, 47, 56]. Повторні заморожування і розморожування не впливають на концентрацію гомоцистеїну в плазмі [56]. Немає різниці між кров'ю гепаринізованою та обробленою ЕДТА [12].

Потрібний об'єм

Більшість методів потребують 50-150 мкл плазми, для менш чутливих способів необхідний об'єм досягає 1000 мкл. Для порівняння – імунологічні аналізи потребують лише 25 мкл.

Відновлення окисленого гомоцистеїну плазми

Усі аналітичні методи для визначення концентрації загального гомоцистеїну включають стадію відновлення перед розділенням та визначенням. Найбільш поширеними відновниками є реактиви, що містять сульфгідрильні групи, наприклад дитіотреїтол (DTT), дитіоеритріол (DTE), меркаптоетанол, борогідрид натрію або калію, трибутилфосфін (TBP). Їх застосування ретельно розглянуто в [54]. Стандарними є такі твердження. Відновлення достатньо проводити з 10-кратним молярним надлишком відновника типу DTT або TCEP, бажано в безкисневому середовищі. Модифікуючі розчини належить готувати безпосередньо перед використанням, максимально захищаючи їх від світла. Реакція відновлення при застосуванні DTT завершується за 2 год при кімнатній температурі, при використанні TBP – за 30 хв.

Але кожен із цих відновників має свої недоліки. Сульфгідрилвмісні відновники можуть

конкурувати з гомоцистеїном за реактиви на подальших етапах одержання похідних, борогідриди не практичні в автоматизованих процедурах внаслідок утворення газів. Крім того, відновлення борогідридом натрію потребує великих затрат часу [49] та дає найбільшу похибку.

На думку [46], сильний неприємний запах трибутилфосфіну (ТБФ) та необхідність розчиняти його в диметилформаміді (внаслідок слабкої розчинності у воді) перешкоджають використанню ТБФ у клінічній лабораторії. Але ми не можемо погодитися з цим. Вважаємо, що запах діетилового ефіру сильніший і більш неприємний. У будь-якому випадку застосування найпростішої витяжної шафи повністю вирішує всі проблеми.

З 1997 року найсучаснішим відновником є трис-(2-карбоксіетил) фосфін (ТСЕР) [24, 43]. Цей реагент нелеткий, легко розчиняється у воді, його розчини порівняно стійкі.

Час відновлення за допомогою ТСЕР не перевищує 1 хв, тоді, як відновлення борогідридом натрію за 30 хв є неповним. Крім того, коефіцієнт варіації між визначеннями із застосуванням ТСЕР у декілька разів нижчий порівняно з методами, що виникли на основі борогідриду натрію [24].

Додаткову інформацію щодо потрібної кількості відновника можна одержати в [28], де показано, що загальний гомоцистеїн плазми має приблизно 4 % відновлювальної здатності плазми за борогідридом.

Окислення гомоцистеїну під час аналізу

Якщо відновник витрачено або видалено в ході аналізу після відновлення, відновлений гомоцистеїн може знову окислитися з повторним утворенням дисульфідів. Реокислення обмежується підвищенням швидкості аналітичних процедур після початкової стадії відновлення або використанням ЕДТА [54]. Урахування часткового реокислення можливе за рахунок введенням внутрішніх стандартів, але лише гомоцистеїн, маркований стійким ізотопом (наприклад дейтерієм) [50], дає точну поправку для будь-якого ступеня реокислення. Цей метод придатний і для неповного відновлення.

Одержання похідних гомоцистеїну

Три активних групи гомоцистеїну (карбонова, аміно й тіо-групи) легко вступають у реакцію з флуоресцентними мітками або хромофорами, які використовують для визначення у ВЕРХ-аналізі із застосуванням УФ або флуоресцентного детектора. Єдиний тип аналізу без дериватизації функціональних груп гомоцистеїну – ВЕРХ-аналіз з електрохімічною детекцією.

Флуоресцентна детекція

Хоча ВЕРХ-методи визначення концентрації гомоцистеїну все ще розвиваються, більшість їх засновано на визначенні флуоресцентних похідних гомоцистеїну [25]. Найбільш поширеною міткою є SBD-F (7-benzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulfonic acid) – мабуть, внаслідок позитивних її властивостей, що не відображено в літературі, бо за [14] флуоресцентні похідні SBD, гомоцистеїну, цистеїну були зовсім нестійкими на світлі, а в темряві зберігались лише декілька годин. Це ускладнює метод та робить його менш придатним для масових вимірювань, призводить до збільшення похибки вимірювання.

Та ж мітка застосовувалась й іншими авторами [5, 53, 56], тривалість хроматографування склала 6 хв, чутливість – 0,16-0,3 мкмоль/л [19, 43, 55].

Ще однією флуоресцентною міткою може бути 7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole-4-sulfonamide (ABD-F), який має деякі переваги перед SBD-F [27]. Дериватизація відбувається протягом 20 хв при температурі 50 °C і pH 8. При pH₂ деривати стійкі не менше 5 діб.

Застосовують і N-[4-(6-dimethylamino-2-benzofuranyl)phenyl]-maleimide (NDB) [40].

13 років тому було синтезовано 4-(N,N-Dimethylaminosulphonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole (DBD-F), здатний замінити собою ABD-F [52]. DBD-F більш реакційноздатний (кількісно реагував із тіолами за 10 хв) та тіол-специфічний, порівняно з ABD-F, ступінь флуоресценції в нього вищий.

Одним із традиційних та поширених флуоресцентних міток є монобромбіман. Ще в 1989 році його застосовували для визначення концентрації гомоцистеїну [28], а чутливість методу складала 4,4 пмоль. Подальшим розвитком використання монобромбіману в ВЕРХ аналізі був метод [36], що дозволяв визначати відновлені, окислені й білокзв'язані форми цистеїну, цистеїнілгліцину, гомоцистеїну і глютаміну в плазмі. Присутність 50 мкМ дитіоеритріолу забезпечує лінійність стандартних кривих при дуже низьких концентраціях тіолів. Метод досить швидкий [42], дає можливість за 6 хв визначити загальну концентрацію найважливіших тіолів плазми, за добу провести до 100 визначень, що є достатньо високим показником. Оскільки для аналізу необхідно лише 10 мкл плазми, то цей метод широко використовують у педіатрії. Межа чутливості складає 50 нмоль/л для всіх тіолів.

У [22] розглянуто новий флуоресцентний маркер – метиловий ефір 4-(6-methoxy-

naphthalen-2-yl)-4-oxo-2-butenoic кислоти. Речовина реагує з тіолами селективно та швидко (10 хв при кімнатній температурі й рН 7,5). При визначенні довжина світла збудження складає 310 nm, емісії – 450 nm. Але в подальшому робіт, виконаних із цим маркером, практично не було. Можливо, він має деякі вади, які ускладнюють його застосування.

Відносно низькі чутливість (до 1 мкМ/л) та точність показав метод [26] із використанням дериватизації о-фталевим діальдегідом. У подальшому цей маркер також не набув широкого застосування.

Унікальну стабільність похідних має новий модифікатор тіолів N-(1-pyrenyl)maleimide (NPM) – до 2 місяців при температурі 4 °С. Метод з його використанням дозволяє розділити та визначити глутатіон, цистеїн, гомоцистеїн, цистеїнілгліцин, похідні γ -глутамілцистеїну. Межа чутливості за глутатіоном – приблизно 50 пмоль. Порівняно з монобромбімановим методом, помітні підвищені селективність, швидкість, чутливість і легкість використання [57].

Застосовують й інші флуоресцентні модифікатори тіолів у комплексі із зворотнофазним ВЕРХ-розділенням продуктів дериватизації: 9-fluorenylmethylchloroformate [15], phenylisothiocyanate (PITC) [6, 18] dimethylaminonaphthalene-sulfonyl хлорид [33].

УФ-детекція

У зв'язку з відносно слабкою чутливістю, методів, заснованих на основі УФ-детекції, є порівняно мало.

Післяколонкова дериватизація

Одним із перших ВЕРХ-методів визначення біологічних тіолів у наномольних кількостях з оптичною детекцією був метод [41], який базувався на післяколонковій дериватизації 6,6'-дитіодінікотиновою кислотою. При цьому, з використанням як елюенту 33 мМ калій-фосфатного буфера (рН 2,2), одночасно визначали концентрацію цистеїну, цистеаміну, гомоцистеїну, глутаміну та пеніциламіну з чутливістю до 0,1 нмоль у колонці.

Набагато нижчу межу чутливості має метод [4], придатний для визначення концентрації гомоцистеїну та інших сульфгідрилів плазми. Плазма відновлюється дитіотреїтолом, білки осаджуються сульфосаліциловою кислотою. При ізократичному елююванні методом іон-парної хроматографії при рН 2,4 і післяколонкової дериватизації 4,4'-дитіодипіридином можливим стає визначення при 324 nm. Межа чутливості за гомоцистеїном – 50 нмоль/л плазми. Усе це занадто гарно, щоб бути правдою.

Ще один відносно простий метод базується на післяколонковій дериватизації ціанонітропрусидним реагентом та детектуванням при 521 nm (цистин) і 524 nm (гомоцистин). Важливим є те, що за присутності нітрату срібла дериватизація проходить лише для гомоцистину. З іншого боку, оптично активні комплекси, що утворюються, стійкі протягом не більше 3 хв для цистину та десятків секунд для гомоцистину [59].

З метою автоматизації методу, розроблено автоматичний аналізатор, в якому забезпечено on-line підмішування нінгідрину в елюент, що виходить із колонки [7]. Цей метод потребує різних високоякісних та дорогих реагентів. З іншого боку, об'єм плазми, необхідний для проведення аналізу, дорівнює лише 20 мкл. Собівартість одного аналізу складає 15 доларів США. Недоліком є те, що загальний час, потрібний для проведення одного аналізу, становить 149 хв.

До речі, нінгідрин є найбільш поширеним модифікатором внаслідок властивих йому технологічних переваг, проте він має один недолік: готовий реактив придатний протягом лише 2 тижнів.

Передколонкова дериватизація

Методи, що базуються на післяколонковій дериватизації, потребують відносно складного апаратурного оформлення, вони малоприменні для серійних визначень. Реагенти повинні відповідати низці суворих вимог, в тому числі мати високу спорідненість із тіолами та надзвичайно малий час реакції. Усе це робить метод дорогим. Тому ширше застосовували методи з передколонковою дериватизацією. У роботах [10, 16] використовували традиційний хромофор – о-фталевий діальдегід. Чутливість методу становила 1 пмоль у колонці, тобто в перерахунку на концентрацію в плазмі – 0,05 мМ.

В автоматичному методі для визначення концентрації амінокислот у сечі [9] використовували о-фталальдегідо-3-меркаптопропіонову кислоту і 9-fluorenylmethyl chloroformate. Повний спектр амінокислот (40 шт.) одержано за 92 хв.

Дериватизацію цистеїну та гомоцистеїну сечі 2-chloro-1-methyl pyridinium йодидом описано в [30]. Результати експерименту показали, що середня концентрація загального цистеїну та гомоцистеїну сечі в нормі склала для жінок (92,0±45,8) і (16,4 ± 4,8) відповідно, для чоловіків – (120,9±46,6) і (21,5±7,4) нмоль/мл.

Можливим є й визначення концентрації гомоцистеїну за допомогою п-хлормеркурибензоату натрію (ПХМБ) (власне дослідження).

Метод розробляли на основі максимальної дешевизни. Він дає можливість визначати одночасно цистеїн, гомоцистеїн і глутатіон, час виходу яких із колонки складає, відповідно, 5, 6, 9 хв.

Внутрішні стандарти

Майже всі дослідники вважають, що використання внутрішнього стандарту, який має хімічну структуру, подібну до будови гомоцистеїну, поліпшує точність методу [37, 45, 54, 56].

Лише в роботі [1] наведено негативні наслідки введення стандарту (меркапропропіонілгліцину, меркаптоетиламіну або N-ацетилцистеїну): зниження відтворюваності, збільшення похибки, уповільнення проведення аналізу. Але це можна пояснити занадто низькими концентраціями реактивів у реакційній суміші.

Найкращим внутрішнім стандартом є, мабуть, цистеамін [45], який було запропоновано замість меркаптопропіонілгліцину і N-ацетилцистеїну [21, 56]. На відміну від цистеаміну, ці речовини виходять із колонки після гомоцистеїну, що збільшує час аналізу. Цистеамін ($\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SH}$) хімічно подібний до гомоцистеїну, його вміст у крові надзвичайно низький (менше 0,1 мкмоль/л) [49], що надає йому необхідні властивості внутрішнього стандарту. Цистеамін не впливає на процес відновлення та визначення концентрації гомоцистеїну в плазмі, а його додавання компенсує вплив розчинника на величину піку гомоцистеїну, що підвищує точність визначення [32].

Електрохімічна детекція

Присутність тіолової групи в гомоцистеїні дає можливість проводити електрохімічну детекцію, засновану на основі реакцій окис-

лення-відновлення. При цьому пробопідготовка потребує менше часу. З іншого боку, електрохімічний детектор у використанні складніший, порівняно з УФ- або флуоресцентним детекторами. Стабільність і точність аналізів залежать від ретельності пробопідготовки, націленої на запобігання забруднення проточної камери та псування Au-Hg-електрода [17], що є великими недоліком електрохімічних детекторів. Взагалі, роботи з їх застосуванням є низкою робіт про усунення тих чи інших суто технічних проблем [11, 13, 34, 35, 37, 38]. Ці методи дозволяють проводити до 30 аналізів на день із нижньою межею визначення 2 пмоль, (за концентрацією – 1,0 мкмоль/л)

Вартісна оцінка методологій

Визначення концентрації гомоцистеїну плазми – це лабораторна процедура, що в 10-20 разів дорожча, ніж більшість стандартних біохімічних процедур типу кількісного визначення холестерину в плазмі. Наведемо наявні на момент написання статті ціни на деякі реактиви, які застосовують при ВЕРХ-визначенні гомоцистеїну. Так, флуоресцентні модифікатори SBD-F, ABD-F, NDB, DBD-F, монобромбіман або йодацетамідофлуоресцеїн коштують 2-5 тис. доларів США за 1 г, УФ-модифікатори ортофталевого альдегіду – 10-15 доларів США за 1 г, ПХМБ – 5 доларів за 1 г. Витрата модифікаторів складає приблизно 0,01-0,02 г на 100 аналізів.

Вартість відновників становить: ТСЕР – 40-45 доларів США за 1 г, дитіеритріолу та дитіотреїтолу – 10-12 доларів США за 1 г, тетрагідроборату натрію – 1 долар США за 1 г, трибутилфосфіну – 0,15-0,18 долара США за 1 г. Витрата відновників складає приблизно 1 г на 100 аналізів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Accinni R., Campolo J., Bartesaghi S. et al. Determination of plasma and serum homocysteine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection // J. Chromatogr. – 1998. – **828**. – P. 397-400.
2. Al-Khafaji F., Bowron A., Day A.P. et al. Stabilization of blood homocysteine by 3-deazaadenosine // Ann. Clin. Biochem. – 1998. – **35**. – P. 780-782.
3. Andersson A., Isaksson A., Hultberg B. Homocysteine export from erythrocytes and its implication for plasma sampling // Clin. Chem. – 1992. – **38**. – P. 1311-1315.
4. Andersson A., Isaksson A., Brattstrom L., Hultberg B. Homocysteine and other thiols determined

in plasma by HPLC and thiol-specific postcolumn derivatization // Clin. Chem. – 1993. – **39**, № 8. – P. 1590-1597.

5. Araki A., Sako Y. Determination of free and total homocysteine in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection // J. Chromatogr. – 1987. – **422**. – P. 43-52.

6. Biggs H.G., Gentilcore L.J. Liquid-chromatographic measurement of amino acids in biological samples after formation of phenylthiohydantoin derivatives // Clin. Chem. – 1984. – **30**. – P. 851-855.

7. Boucher J.L., Charret C., Coudray-Lucas C. et al. Amino acid determination in biological fluids by automated ion-exchange chromatography: performan-

- ce of Hitachi L-8500A // Clin. Chem. – 1997. – **43**. – P. 1421-1428.
8. Brattstrom L.E., Israelsson B., Jeppsson J.O., Hultberg B.L. Folic acidan innocuous means to reduce plasma homocysteine. // Scand. J. Clin. Lab. Invest. – 1988. – **48**. – P. 215-221.
9. Carducci C., Birarelli M., Leuzzi V. et al. Automated method for the measurement of amino acids in urine by high-performance liquid chromatography // J. Chromatogr. – 1996. – **729**, № 1-2. – P. 173-180.
10. Carducci C., Birarelli M., Nola M., Antonozzi I. Automated high-performance liquid chromatographic method for the determination of homocysteine in plasma samples // J. Chromatogr. – 1999. – **846**, № 1-2. – P. 93-100.
11. Cole D.E.C., Lehotay D.C., Evrovski J. Simplified Simultaneous Assay of Total Plasma Homocysteine and Methionine by HPLC and Pulsed Integrated Amperometry // Clin. Chem. – 1998. – **44**. – P. 188-190.
12. Daskalakis I., Luccock M.D., Anderson A. et al. Determination of plasma total homocysteine and cysteine using HPLC with fluorescence detection and an ammonium 7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole-4-sulphonate (SBD-F) derivatization protocol optimized for antioxidant concentration, derivatization reagent concentration, temperature and matrix pH // Biomed. Chromatogr. – 1996. – № 10(5). – P. 205-212.
13. D'Eramo J.L., Finkelstein A.E., Boccazzi F.Q., Fridman O. Total homocysteine levels in plasma: high-performance liquid chromatographic determination with electrochemical detection and glassy carbon electrode // J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. – 1998. – **720**, № 1-2. – P. 205-210.
14. Dudman N.P., Guo X.W., Crooks R. et al. Assay of plasma homocysteine: light sensitivity of the fluorescent 7-benzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulfonic acid derivative, and use of appropriate calibrators // Clin. Chem. – 1996. – **42**, № 12. – P. 2028-2032.
15. Einarsson S., Josefsson B., Lagerkvist S. Determination of amino acids with 9-fluorenylmethylchloroformate and reversed-phase high-performance liquid chromatography // J. Chromatogr. – 1983. – **282**. – P. 609-618.
16. Fermo I., Arcelloni C., De Vecchi E. et al. High-performance liquid chromatographic method with fluorescence detection for the determination of total homocyst(e)ine in plasma // J. Chromatogr. – 1992. – **28:593**, № 1-2. – P. 171-176.
17. Fermo I., De Vecchi E., Arcelloni C. et al. Methodological aspects of total plasma homocysteine measurement [technical note] // Haematologica. – 1997. – **82**. – P. 246-250.
18. Feste A.S. Reversed-phase chromatography of phenylthiocarbonyl amino acid derivatives of physiological amino acids: an evaluation and comparison with analysis by ion-exchange chromatography // J. Chromatogr. – 1992. – **574**. – P. 23-34.
19. Feussner A., Rolinski B., Weiss N. et al. Determination of total homocysteine in human plasma by isocratic high-performance liquid chromatography // Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. – 1997. – **35**, № 9. – P. 687-691.
20. Fiskerstrand T., Refsum H., Kvalheim G., Ueland P.M. Homocysteine and other thiols in plasma and urine: automated determination and sample stability // Clin. Chem. – 1993. – **39**. – P. 263-271.
21. Fortin L.J., Genest J. Measurement of homocyst(e)ine in the prediction of arteriosclerosis // Clin. Biochem. – 1995. – **28**. – P. 155-162.
22. Gatti R., Cavrini V., Roveri P., Pinzauti S. High-performance liquid chromatographic determination of aliphatic thiols with aroylacrylic acids as fluorogenic precolumn derivatization reagents // J. Chromatogr. – 1990. – **16**, № 507. – P. 451-458.
23. Gautier F.C., Berneron C., Douce P.J. Determination of homocysteine in plasma by liquid chromatography with fluorescence detection // Biomed. Chromatogr. – 1999. – **13**, № 3. – P. 239-243.
24. Gilfix B.M., Blank D.W., Rosenblatt D.S. Novel reductant for determination of total plasma homocysteine // Clin. Chem. – 1997. – **43**. – P. 687-688.
25. Goodman S.I., Elsas L.J., Rosenblatt D.S. ASHG/ACMG statement. Measurement and use of total plasma homocysteine // Am. J. Hum. Genet. – 1998. – **63**. – P. 1541-1543.
26. Hyland K., Bottiglieri T. Measurement of total plasma and cerebrospinal fluid homocysteine by fluorescence following high-performance liquid chromatography and precolumn derivatization with o-phthalaldehyde // J. Chromatogr. – 1992. – **579**, № 1. – P. 55-62.
27. Jacob N., Guillaume L., Garcon L., Foglietti M.J. Determination of total plasma homocysteine and other aminothiols by liquid chromatography coupled to the detection by fluorescence // Ann. Biol. Clin. (Paris). – 1997. – **55**, № 6. – P. 583-591.
28. Jacobsen D.W., Gatautis V.J., Green R. Determination of plasma homocysteine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection // Anal. Biochem. – 1989. – **178**, № 1. – P. 208-214.
29. Jayatilleke E., Shaw S. A high-performance liquid chromatographic assay for reduced and oxidized glutathione in biological samples // Anal. Biochem. – 1993. – **214**, № 2. – P. 452-457.
30. Kaniowska E., Chwatko G., Glowacki R. et al. Urinary excretion measurement of cysteine and homocysteine in the form of their S-pyridinium derivatives by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection // J. Chromatogr. – 1998. – **798**, № 1-2. – P. 27-35.
31. Kleinman W.A., Richie J.P.J. Status of glutathione and other thiols and disulfides in human plasma // Biochem. Pharmacol. – 2000. – **60**, № 1. – P. 19-29.
32. Kuo K., Still R., Cale S., McDowell I. Standardization (External and Internal) of HPLC Assay for Plasma Homocysteine // Clin. Chem. – 1997. – **43**. – P. 1653-1655.
33. MacClung G., Frankenberger W.T. Comparison of reverse-phase high-performance liquid chromatographic methods for precolumn-derivatized amino acids // J. Liq. Chromatogr. – 1988. – **11**. – P. 613-646.

34. Malinow M.R., Kang S.S., Taylor L.M. et al. Prevalence of hyperhomocyst(e)inemia in patients with peripheral arterial occlusive disease // *Circulation*. – 1989. – **79**. – P. 1180-1188.
35. Malinow M.R., Nieto F.J., Szklo M. et al. Carotid artery intimal-medial wall thickening and plasma homocyst(e)ine in asymptomatic adults. The Atherosclerosis Risk in Communities Study // *Circulation*. – 1993. – **87**. – P. 1107-1113.
36. Mansoor M.A., Svardal A.M., Ueland P.M. Determination of the in vivo redox status of cysteine, cysteinylglycine, homocysteine, and glutathione in human plasma // *Anal. Biochem.* – 1992. – **200**, № 2. – P. 218-229.
37. Martin S.C., Tsakas-Ampatzis I., Bartlett W.A., Jones A.F. Measurement of plasma total homocysteine by HPLC with coulometric detection // *Clin. Chem.* – 1999. – **45**. – P. 150-152.
38. Melnyk S., Pogribna M., Pogribny I. et al. A new HPLC method for the simultaneous determination of oxidized and reduced plasma aminothiols using coulometric electrochemical detection // *J. Nutr. Biochem.* – 1999. – **10**. – P. 490-497.
39. Moller J., Rasmussen K. Homocysteine in plasma: stabilization of blood samples with fluoride // *Clin. Chem.* – 1995. – **41**. – P. 758-759.
40. Nakashima K., Umekawa C., Yoshida H. et al. High-performance liquid chromatography-fluorometry for the determination of thiols in biological samples using N-[4-(6-dimethylamino-2-benzofuranyl) phenyl]-maleimide // *J. Chromatogr.* – 1987. – **414**, № 1. – P. 11-17.
41. Nishiyama J., Kuninori T. Assay of biological thiols by a combination of high-performance liquid chromatography and postcolumn reaction with 6,6'-dithiodinicotinic acid // *Anal. Biochem.* – 1984. – **138**, № 1. – P. 95-98.
42. Pastore A., Massoud R., Motti C. et al. Fully automated assay for total homocysteine, cysteine, cysteinylglycine, glutathione, cysteamine, and 2-mercaptopropionyl-glycine in plasma and urine // *Clin. Chem.* – 1998. – **44**. – P. 825-832.
43. Pfeiffer C.M., Huff D.L., Gunter E.W. Rapid and accurate HPLC assay for plasma total homocysteine and cysteine in a clinical laboratory setting // *Clin. Chem.* – 1999. – **45**. – P. 290-292.
44. Pfeiffer C.M., Huff D.L., Smith S.J. et al. Comparison of plasma total homocysteine measurements in 14 laboratories: an international study // *Clin. Chem.* – 1999. – **45**. – P. 1261-1268.
45. te Poele-Pothoff M.T., van den Berg M., Franken D.G. et al. Three different methods for the determination of total homocysteine in plasma // *Ann. Clin. Biochem.* – 1995. – **32**. – P. 218-220.
46. Rasmussen K., Moller J. Total homocysteine measurement in clinical practice // *Ann. Clin. Biochem.* – 2000. – **37**. – P. 627-648.
47. Refsum H., Fiskerstrand T., Guttormsen A.B., Ueland P.M. Assessment of homocysteine status // *J. Inher. Metab. Dis.* – 1997. – **20**. – P. 286-294.
48. Regland B., Andersson M., Abrahamsson L. et al. Increased concentrations of homocysteine in the cerebrospinal fluid in patients with fibromyalgia and chronic fatigue syndrome // *Scand. J. Rheumatol.* – 1997. – **26**. – P. 301-307.
49. Smolin L.A., Schneider J.A. Measurement of total plasma cysteamine using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection // *Anal. Biochem.* – 1988. – **168**. – P. 374-379.
50. Stabler S.P., Marcell P.D., Podell E.R., Allen R.H. Quantitation of total homocysteine, total cysteine, and methionine in normal serum and urine using capillary gas chromatography-mass spectrometry // *Anal. Biochem.* – 1987. – **162**. – P. 185-196.
51. Stabler S.P., Allen R.H., Barrett R.E. et al. Cerebrospinal fluid methylmalonic acid levels in normal subjects and patients with cobalamin deficiency // *Neurology*. – 1991. – **41**. – P. 1627-1632.
52. Toyooka T., Suzuki T., Saito Y. et al. A novel fluorogenic reagent for thiols: 4-(N,N-dimethylaminosulphonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole // *Analyst*. – 1989. – **114**, № 4. – P. 413-419.
53. Ubbink J.B., Hayward-Vermaak W.J., Bissbort S. Rapid high-performance liquid chromatographic assay for total homocysteine levels in human serum // *J. Chromatogr.* – 1991. – **565**. – P. 441-446.
54. Ueland P.M., Refsum H., Stabler S.P. et al. Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications // *Clin. Chem.* – 1993. – **39**. – P. 1764-1779.
55. Utam C.G., Zheng Zhi-Jie, Folsom A.R. et al. Short-term and long-term variability of plasma homocysteine measurement // *Clin. Chem.* – 1997. – **43**. – P. 141-145.
56. Vester B., Rasmussen K. High performance liquid chromatography method for rapid and accurate determination of homocysteine in plasma and serum // *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* – 1991. – **29**. – P. 549-554.
57. Winters R.A., Zukowski J., Ercal N. et al. Analysis of glutathione, glutathione disulfide, cysteine, homocysteine and other biological thiols by high-performance liquid chromatography following derivatization by n-(1-pyrenyl)maleimide // *Anal. Biochem.* – 1995. – **227**, № 1. – P. 14-21.
58. Woltersdorf W.W., Bowron A., Day A.P. et al. Abbott IMx homocysteine assay: significant interference by 3-deazaadenosine [letter] // *Ann. Clin. Biochem.* – 1999. – **36**. – P. 533.
59. Wu J.T., Wilson L.W., Christensen S. Conversion of a qualitative screening test to a quantitative measurement of urinary cystine and homocysteine // *Ann. Clin. Lab. Sci.* – 1992. – **22**, № 1. – P. 18-29.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ГОМОЦИСТЕИНА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

А.А. Пентюк, А.В. Ильченко, С.В. Шевчук, И.И. Андрушко, О.П. Данченко
ВИННИЦКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. Н.И. ПИРОГОВА

Резюме

Приведен сравнительный анализ аппаратуры и реагентов, которые применяют при определении концентрации гомоцистеина в биологических жидкостях методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гомоцистеин, высокоэффективная жидкостная хроматография, ишемия, инфаркт миокарда.

DETERMINATION OF HOMOCYSTEINE CONCENTRATION IN BIOLOGICAL FLUIDS BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

A.A. Pentiuk, A.V. Ilchenko, S.V. Shevchuk, I.I. Andrushko, O.P. Danchenko
VINNYTSIA STATE MEDICAL UNIVERSITY BY M.I. PYROHOV

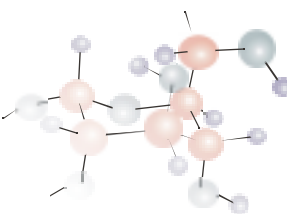
Summary

The comparative review of instrumentation and reagents used at determination of homocysteine concentration in biological fluids by means of high performance liquid chromatography is given.

KEY WORDS: homocysteine, high-performance liquid chromatography, ischemia, myocardial infarction.

Отримано 19.024.2001 р.

Адреса для листування: О.В. Ильченко, вул. 600-річчя, 32, кв. 27, 21021, Вінниця, Україна; e-mail: ilch@vsmu.vinnica.ua.



Видавництво “УКРМЕДКНИГА”
Підручник “Біохімія людини”
Автори: д.м.н., проф. Я.І. Гонський, к.м.н., доц. Т.П. Максимчук

У підручнику на основі сучасних досягнень науки викладено головні поняття з усіх розділів біохімії людини відповідно до програми для студентів медичних та фармацевтичних факультетів вищих навчальних закладів. Розглянуто структуру та метаболізм білків, вуглеводів, ліпідів, нуклеїнових кислот та інших органічних і неорганічних речовин. Наведено сучасні дані з біохімії крові, нервової та сполучної тканин, м'язів, печінки, нирок, висвітлено механізми функціонування імунної системи та структуру і функції мембранних утворень у клітинах. Наведено матеріали з клінічної біохімії та молекулярної біології. Велику роль відведено висвітленню регуляції метаболічних процесів і їх порушень при найпоширеніших патологічних станах печінки, нирок, серцево-судинної системи, ендокринних органів, спадкових захворюваннях.

З метою полегшення засвоєння матеріалу в підручник введено типові тестові завдання з різних розділів біохімії та відповіді на них, а також тлумачний словник найпоширеніших біохімічних термінів.

Підручник буде корисний для аспірантів, лікарів та біологів, які цікавляться біологічними процесами, що перебігають у живому організмі на молекулярному рівні.

Підручник можна замовити за адресою:
Видавництво “Укрмедкнига”, майдан Волі, 1, м.Тернопіль, 46001
тел./факс (0352)22-80-09; тел. 22-97-29

УДК 615.224:547.587.11:661.12

**СУДОВА ХІМІКО-ФАРМАЦЕВТИЧНА ОЦІНКА ВИЗНАЧЕННЯ
ДОМІШКИ КИСЛОТИ САЛІЦИЛОВОЇ В СИЛЬНОДІЮЧОМУ
КАРДІОЛОГІЧНОМУ ЗАСОБІ**

В.В. Шаповалов¹, В.О. Шаповалова², Л.В. Друшлякова², Ю.І. Губський³

СЛІДЧЕ УПРАВЛІННЯ УМВС УКРАЇНИ В ХАРКІВСЬКІЙ ОБЛАСТІ¹

КАФЕДРА СУДОВОЇ ФАРМАЦІЇ НАЦІОНАЛЬНОЇ ФАРМАЦЕВТИЧНОЇ АКАДЕМІЇ УКРАЇНИ, ХАРКІВ²

НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ, КИЇВ³

У статті наведено судову хіміко-фармацевтичну оцінку визначення домішки кислоти саліцилової у комбінованому кардіологічному засобі.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: домішка, саліцилова кислота, ацетилсаліцилова кислота, комбінований кардіологічний препарат.

ВСТУП. Відомо, що ацетилсаліцилова кислота (АСК) є високоефективним засобом лікування ішемічної хвороби серця (ІХС), бо завдяки її дії частота інфаркту міокарда і раптової коронарної смерті зменшується на 50 % [6, 7, 8]. Тому АСК широко використовують у клініці захворювань ІХС як дезагрегаційний засіб.

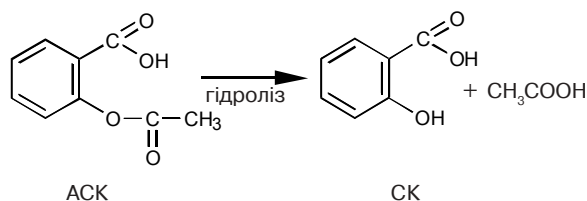
У зв'язку з цим актуальним питанням є створення нового комбінованого препарату, який би об'єднував у собі антиагрегаційні та антиангінальні властивості [9]. Таким препаратом є розроблений нами комбінований лікарський засіб (ЛЗ) такого складу на одну таблетку: пропранолол (П) – 0,02 г; кислота ацетилсаліцилова – 0,05 г; допоміжні речовини (крохмаль картопляний, кальцію стеарат, цукор) – до отримання таблетки масою 0,2 г.

На сьогодні в Україні створено систему державного та галузевого контролю за якістю ЛЗ, яка сприяє загальному підвищенню якості медикаментів [5]. При вивченні якості нових ЛЗ одним із найважливіших питань є контроль та стандартизація вмісту домішок [13, 15]. Усе це зумовлює посилене проведення досліджень домішок ЛЗ різноманітних класифікаційно-правових груп [10].

Згідно із сучасними вимогами до ЛЗ, що містять АСК, як домішки визначають кислоту саліцилову (СК), яка є продуктом гідролізу АСК

і тому повинна контролюватися та нормуватися [3, 12, 14].

На схемі показано гідроліз АСК:



Враховуючи, що в процесі зберігання розробленого препарату може накопичуватися СК при частковому гідролізі АСК, ми поставили перед собою завдання використати судові хіміко-фармацевтичні методи аналізу для розробки методики контролю за цією домішкою.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Об'єктом дослідження було обрано таблетки розробленого на основі пропранололу та АСК комбінованого ЛЗ, що за судово-фармацевтичним критерієм належить до сильнодіючих засобів.

В основу розробки методики кількісного визначення кислоти саліцилової в новому комбінованому кардіологічному ЛЗ покладено спроможність СК утворювати комплекси з розчином хлориду окисного заліза [6].

Для виконання поставленого завдання нами було проведено дослідження із застосуванням однохвильової спектрофотометрії в помітній ділянці спектра з використанням методу стандарту (МС).

© В.В. Шаповалов – к.фарм.н., В.О. Шаповалова – д.фарм.н., проф., Л.В. Друшлякова, Ю.І. Губський – чл.-кор. АМН України, д.м.н., проф., 2001.

При адаптації МС у помітній ділянці спектра для контролю за домішкою СК у новому комбінованому ЛЗ було вжито пошукових заходів щодо критеріїв для вибору комплексоутворювача, які включали:

- вибірність реагенту;
- чутливість реакції;
- стабільність комплексу саліцилату заліза;
- індиферентність комплексу саліцилату заліза відносно допоміжних речовин об'єкта дослідження;

- доступність реагенту.

Дотримуючись вищезазначених критеріїв вибору реагенту, для утворення комплексу саліцилату заліза ми використали розчин хлориду окисного заліза, який здатний поглинати в помітній ділянці спектра.

Для розробки умов проведення реакції за вищевказаними критеріями було проведено дослідження в таких напрямках:

- вивчення впливу температури та рН середовища на стабільність комплексу;
- вивчення впливу концентрації хлориду окисного заліза на умови утворення комплексу з АСК;
- вивчення поведінки спектрів поглинання комплексу саліцилату заліза;
- вивчення динаміки залежності оптичної густини (D) комплексу саліцилату заліза від концентрації (C) КС;
- вивчення стабільності комплексу саліцилату заліза.

На підставі проведених досліджень вибрано оптимальні умови для визначення домішки СК у комбінованому препараті.

Стабільність комплексу саліцилату заліза вивчали за допомогою спектрофотометрії в максимумі поглинання при довжині хвилі 525 нм через рівні проміжки часу.

Було розроблено методику кількісного визначення домішки кислоти саліцилової в комбінованому ЛЗ.

Методику кількісного визначення СК здійснювали за такою схемою. Наважку препарату (в наважці повинно бути близько 0,17 г АСК) вміщували в мірну колбу ємкістю 25 мл, додавали 20 мл хлороформу і перемішували протягом 2 хв, потім доводили об'єм розчину хлороформом до мітки, перемішували та фільтрували. 2 мл отриманого розчину вміщували в ділильну лійку ємкістю 50 мл, додавали 8 мл води, 2 мл розчину хлориду заліза окисного і перемішували протягом 2-3 хв. Після розділення шарів нижній відкидали, а верхній фільтрували через паперовий фільтр, відкидаючи перші порції фільтрату.

Вимірювали оптичну густину досліджуваного розчину і робочого стандартного зразка (РСЗ) на спектрофотометрі при довжині хвилі 525 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм, використовуючи як розчин порівняння воду.

Стандартом вибрали СК із вмістом основної речовини не менше 99,5 %, яка стабільна при зберіганні.

Вміст СК (X, %) в одній таблетці визначали за формулою:

$$X = \frac{D_1 \cdot m_0 \cdot 10 \cdot b}{D_0 \cdot m \cdot m_1}$$

де D_1 – оптична густина досліджуваного розчину;

D_0 – оптична густина розчину РСЗ кислоти саліцилової;

m_0 – маса наважки РСЗ кислоти саліцилової, в грамах;

m_1 – маса наважки препарату, в грамах;

b – середня маса таблетки, в грамах;

m – маса номінального вмісту АСК у об'єкті дослідження, в грамах.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. У ході експерименту було встановлено, що спектри поглинання комплексу саліцилату заліза у воді (1, 2 та 3) характеризуються максимумом поглинання при довжині хвилі 525 нм (рис. 1).

Дослідження з вивчення стабільності комплексу саліцилату заліза у воді показали, що він стійкий протягом 1 год (рис. 2).

Як видно з рисунка 2, пряма на графіку відповідає тривалості стабільності комплексу саліцилату заліза та складає приблизно 60 хв, що цілком достатньо для проведення вимірювань під час аналізу СК, після цього часу комплекс стає нестійким, що підтверджується зростанням оптичної густини.

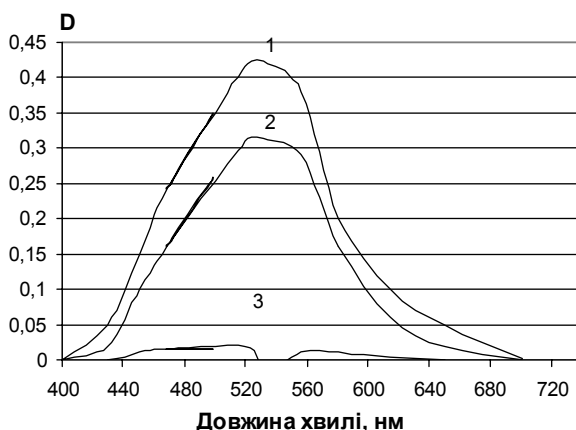


Рис. 1. Спектри поглинання комплексу саліцилату заліза у воді, отриманого з робочого стандартного зразка (РСЗ) кислоти саліцилової (1), досліджуваного розчину препарату (2) та плацебо (3).

На підставі вивченої залежності оптичної густини (D) від концентрації саліцилату заліза (C, мкг/мл) встановлено, що D лінійно залежить від C у межах концентрації від 10 до 50 мкг/мл (рис. 3).

Як видно з рисунка 3, залежність $D=f(C)$ підкоряється закону Ламберта – Бугера – Бера [1, 2]. Концентрація комплексу саліцилату заліза, яку визначають, складає 33,3 мкг/мл.

У ході дослідження було встановлено, що вміст СК, розраховуючи на середню масу таблетки, не перебільшував 3 %.

Точність методики кількісного визначення СК встановлено на модельних сумішах препарату і наведено в табл. 1.

Дані таблиці 1 вказують на те, що відносна помилка кількісного визначення (ϵ , %) СК

складає 1,47 %, що свідчить про високі точність, чутливість визначення і відтворюваність результатів. Результати аналізу (μ) не обтяжені систематичною помилкою.

Результати експерименту показали, що в досліджуваному препараті в процесі зберігання за один рік накопичується не більше 3 % домішок (рис. 4).

На рис. 4 показано, що протягом 18 місяців зберігання препарату рівень СК знаходиться в межах не більше 3 %.

Таким чином, запропонована методика кількісного визначення СК має високі точність та експресність і тому може використовуватися при проведенні судової хіміко-фармацевтичної оцінки для розв'язання кваліфікаційних задач за об'єктами дослідження.

Таблиця 1 – Метрологічні характеристики методики кількісного визначення кислоти саліцилової в модельних сумішах об'єкта дослідження

C, %	f	X'_{cp} , %	S^2	S_x	$P(f, t)$	t	ΔX_{cp}	ϵ , %	μ
3,0	5	3,01	0,001	0,016	0,95	2,778	0,044	1,47	–

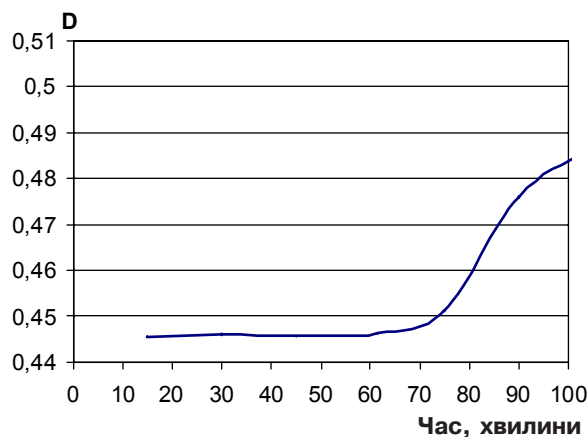


Рис. 2. Залежність оптичної густини (D) саліцилату заліза у воді від часу.

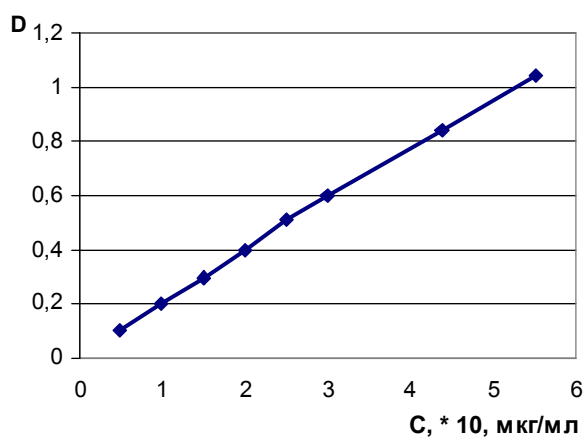


Рис. 3. Залежність оптичної густини саліцилату заліза у воді від концентрації.

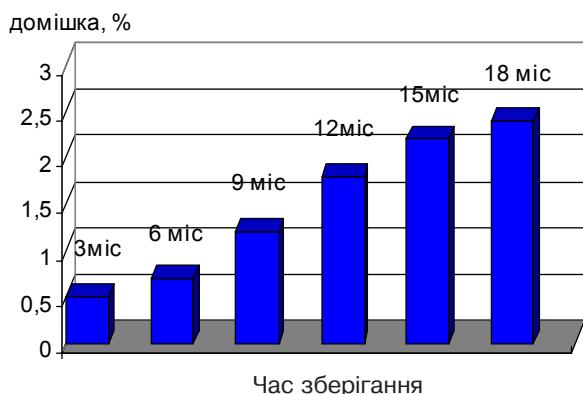


Рис. 4. Залежність відсотка утворення домішки кислоти саліцилової в процесі зберігання об'єкта дослідження.

ВИСНОВКИ. 1. Проведено дослідження можливості застосування однохвильового спектрофотометричного методу аналізу в помітній ділянці спектра для контролю за якістю різноманітних класифікаційно-правових груп ЛЗ, які містять АСК.

2. Вивчено умови використання комплексоутворювача для утворення комплексу саліцилату заліза з метою оптимізації його кількісного визначення в комбінованому препараті для кардіології.

3. Розроблено судову хіміко-фармацевтичну методику кількісної оцінки кислоти саліцилової, яка є продуктом гідролізу АСК, у новому препараті, що поєднує властивості бета-адреноблокатора (пропранолола) та дезагреганта (АСК).

ЛІТЕРАТУРА

1. Берштейн И.Я. Выбор степени переопределения при спектрофотометрическом анализе многокомпонентных смесей // Журн. аналит. хим. – 1988. – **43**, № 11. – С. 1962-1967.
2. Берштейн И.Я., Каменский Ю.Л. Спектрофотометрический анализ в органической химии. – Л.: Химия, 1986. – 199 с.
3. Государственная фармакопея. – М.: Медицина, 1990. – 397 с.
4. Шаповалова В.А., Черных В.П., Заболотный В.А. и др. Исследования в области нового препарата на основе пропранолола и ацетилсалициловой кислоты // Проблемы и перспективы развития в клинике внутренних болезней. – Харьков: Институт терапии АМН Украины, 1996. – С. 253-257.
5. Машковский М.Д. Лекарственные средства. – Харьков: Торсинг, 1997. – **1**. – С. 165-167.
6. Спіженко Ю.П. Основні проблеми фармацевтичного сектора України // Ліки України. – 1999. – № 10-11. – С. 4-15.
7. Лекарственные препараты в России: Справочник. – М.: АстраФармСервис, 1997. – 1504 с.
8. Шаповалова В.А., Стефанов А.В., Бухтиарова Т.А., Шаповалов В.В. Лекарственные средства в кардиологии. – Харьков: Торсинг, 2000. – 624 с.
9. Шаповалова В.А., Шаповалов В.В. Справочник по правовой и судебной фармации. – Харьков: Торсинг, 1997. – С. 195-210.
10. Шаповалов В.В., Шаповалова В.А., Друшлякова Л.В. Судово-фармацевтичний аналіз ринку кардіологічних препаратів та обґрунтування доцільності створення нового комбінованого засобу на основі сильнодіючих речовин // Ліки України. – 2000. – № 3. – С. 19-23.
11. Уильямс У.Дж. Определение анионов. – М.: Химия, 1984. – С. 97-98.
12. British Pharmacopoeia. – London, 1988. – 1-2. – 2040 p.
13. Mahalanobis K.K., Basu D., Roy D. Simultaneous spectrophotometric determination of benzoic and calicylic acids contents in ointment by least squares method in matrix form // Indian J. Pharm. Sci. – 1990. – **52**, № 2. – P. 98-99.
14. The United States Pharmacopoeia 23. – Kway, Rockville. – MD. – 1995. – 5991 p.
15. Sharma Suresh C., Sharma Satish C., Saxena R.S. Simultaneous spectrophotometric analysis of ternary mixture of pharmaceuticals-assay for aspirin, paracetamol and caffeine mixtures // Indian Y. Pharm. Sci. – 1990. – **52**, № 2. – P. 105-107.

СУДЕБНАЯ ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРИМЕСИ КИСЛОТЫ САЛИЦИЛОВОЙ В СИЛЬНОДЕЙСТВУЮЩЕМ КАРДИОЛОГИЧЕСКОМ СРЕДСТВЕ

В.В. Шаповалов¹, В.О. Шаповалова², Л.В. Друшлякова², Ю.І. Губський³
 СЛЕДСТВЕННОЕ УПРАВЛЕНИЕ УМВД УКРАИНЫ И ХАРКОВСКОЙ ОБЛАСТИ¹
 КАФЕДРА СУДЕБНОЙ ФАРМАЦИИ НАЦИОНАЛЬНОЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ
 АКАДЕМИИ УКРАИНЫ, ХАРЬКОВ²

НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. А.А. БОГОМОЛЬЦА, КИЕВ³

Резюме

В статье приведена судебная химико-фармацевтическая оценка определения примеси кислоты салициловой в комбинированном кардиологическом средстве.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **примесь, салициловая кислота, ацетилсалициловая кислота, комбинированный кардиологический препарат.**

FORENSIC CHEMICO-PHARMACEUTICAL ESTIMATION OF SALICYLIC ACID ADMIXTURE DETERMINATION IN DRASTIC CARDIOLOGIC REMEDY

V.V. Shapovalov¹, V.A. Shapovalova², L.V. Drushlyakova², Yu.I. Hubsy³
 INQUEST ADMINISTRATION OF AMIA OF UKRAINE IN KHARKIV REGION¹
 CHAIR OF FORENSIC PHARMACY OF NATIONAL PHARMACEUTICAL ACADEMY OF UKRAINE, KHARKIV²
 NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY BY O.O. BOHOMOLETZ, KYIV³

Summary

Forensic chemico-pharmaceutical estimation of salicylic acid admixture determination in combined remedy for cardiology is presented in this article.

KEY WORDS: **admixture, salicylic acid, acetylsalicylic acid, combined cardiological medicine.**

Отримано 19.02.2001 р.

Адреса для листування: В.В. Шаповалов, вул. Наталі Ужвій, 62/252, Харків, 61195, Україна.

ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ТРИПСИНОПОДІБНОЇ ПРОТЕАЗИ З ЛЕГЕНІВ БІЛИХ МИШЕЙ

В.А. Дівоча, С.Ю. Сова, В.М. Михальчук
ОДЕСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Наявність у вірусних препаратах антигенних компонентів клітини-хазяїна відіграє значну роль у процесах реплікації вірусу. Виникла нагальна потреба ідентифікувати та описати характеристики протеаз для подальшого розуміння вірусного патогенезу та противірусної стратегії. Під час досліджень із легенів здорових та інфікованих грипом білих мишей було виділено протеазу трипсиноподібного типу. При її очищенні методом іонообмінної хроматографії на ДЕАЕ-целюлозі трипсиноподібну протеазу здорових мишей було поділено на 6 піків, які мали високу протеолітичну активність. З легенів тварин, інфікованих вірусом грипу А, виділено тільки 2 ізоферменти.

Доочищення ізоферментів методом діалізу призводило до зниження протеолітичної активності. Після ліофільного висушування ізоферментів трипсиноподібної протеази зберігалась протеолітична активність.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **вірус грипу, легені, трипсиноподібна протеаза, ізоферменти, очищення ферментів.**

ВСТУП. Наявність у вірусних препаратах антигенних компонентів, джерелом походження яких є клітина-хазяїн, відіграє велику роль у процесах реплікації вірусу [3, 4]. Клітинні ферменти трипсиноподібної протеази, за даними літератури, поділяють молекулу гемаглютиніну вірусу грипу на дві субодиниці (НА1 та НА2), які дають початок новому інфекційному процесу [5, 6]. Однак на сьогодні мало що відомо про протеази, які беруть участь у розщепленні вірусних білків. Тому є потреба ідентифікувати та описати характеристики протеаз для подальшого розуміння вірусного патогенезу.

Завданням даного дослідження було виділити та очистити трипсиноподібну протеазу з легенів здорових білих мишей та після їх інфікування вірусом грипу.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. У роботі застосували вірус грипу А/PR78/34 (H1N1), адаптований до легеневої тканини білих мишей. Інфекційний титр вірусу складав $7,0 \lg EID_{50/0,2}$ мл. Вірус отримали з лабораторії музейних штамів Інституту вірусології ім. Д.І. Івановського АМН Росії. Використали 530 білих безпородних мишей масою тіла 16-17 г (по 100 тварин на дослід). Інфікування

тварин вірусом грипу А проводили інтраназально в об'ємі 0,05 мл під легким ефірним наркозом у концентрації 10^{-6} , що відповідало інфекційній дозі вірусу 1 ЛД₅₀. Через 72 год після інфікування мишей під глибоким ефірним наркозом забивали та діставали легені, паралельно забирали кров. Легені роздрібноували ножицями, потім гомогенізували в ступці, обробляли ультразвуком при 18 Гц на приладі Soniprep 150 MSE (всю роботу виконували на холоді) (рис. 1). Гомогенат центрифугували при 10 000 об./хв і температурі +4 °С упродовж 1 год на центрифугу RC-5 Sorvall Instruments. До осаду додавали 1 % тритону X-100 і залишали до ранку в холодильнику. Наступного дня осад знову обробляли ультразвуком, центрифугували при вищенаведених параметрах. Супернатанти 1, 2 і 3 об'єднували та використовували в подальшому для очищення. Очищення діалізованого матеріалу проводили методом іонообмінної хроматографії на сервацел ДЕАЕ-целюлозі-32 на приладі ZKB-2023, Minicololab (Broma). Колонка мала висоту 18 см. Ступінь очищення контролювали за вмістом білка та активністю протеази. Вміст білка визначали за методом W. Lowry [7], а протамінрозщеплювальну активність – за методом К. Веремієнка [1] у модифікації С.В. Вовчук [2]. Фракції, що мали високі показники протеази після хроматографії, піддавали додатковій

© В.А. Дівоча – к.м.н., С.Ю. Сова, В.М. Михальчук – к.м.н., 2001.

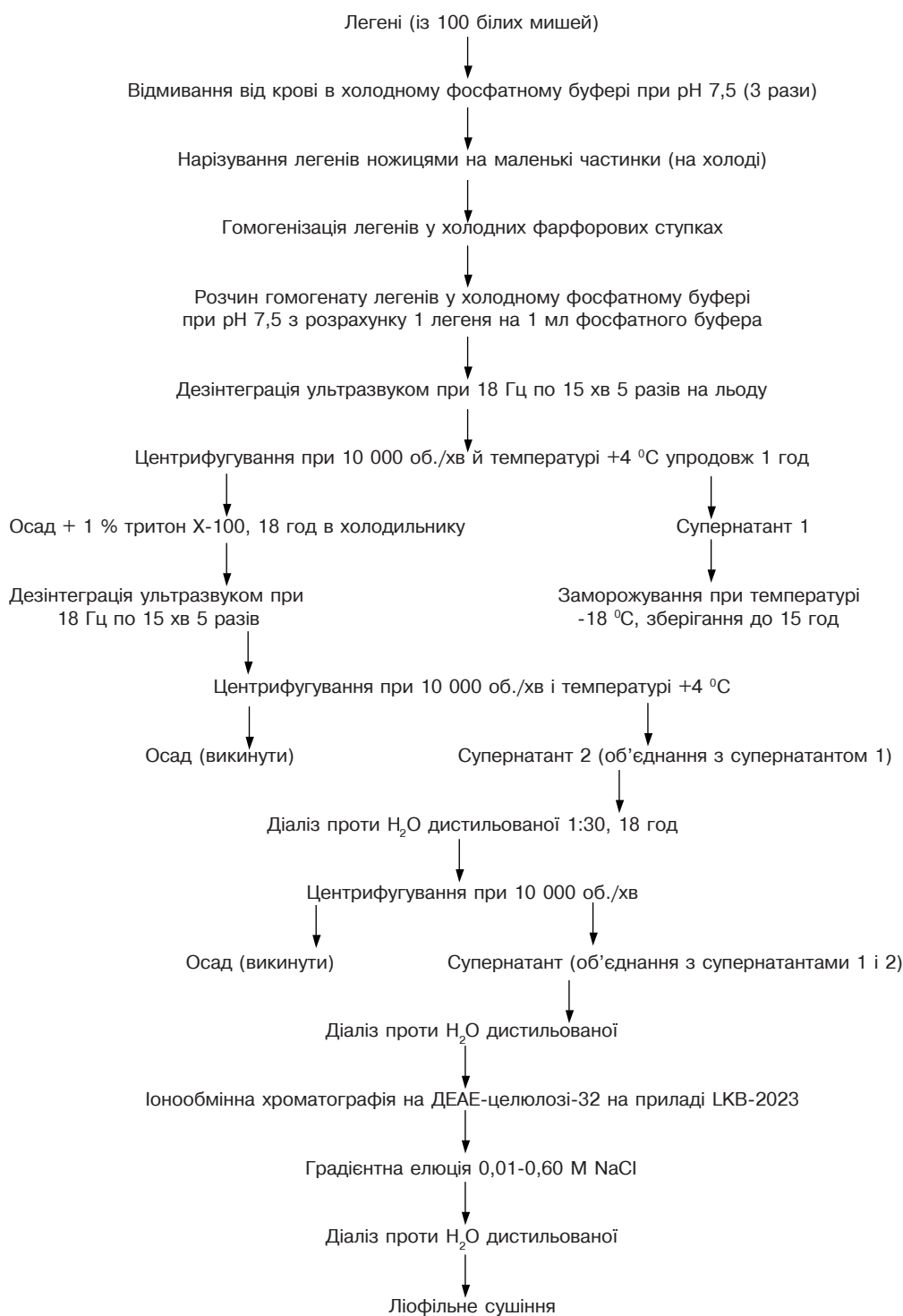


Рис 1. Схема виділення та очищення трипсиноподібної протеази з легенів білих мишей.

очистці за допомогою діалізу. Потім їх ліофільно висушували на приладі Hetacite Heto (Данія). У подальшому ці фракції використовували для визначення в них інфекційної, гемаглютинуючої, протеазної активностей та вмісту білка. Легені здорових мишей (100 тварин на дослід) піддавали тій же обробці, що й інфікованих, тільки в них визначали протеазну активність та вміст білка.

Інфекційний титр вірусу в легенях інфікованих мишей і алантоїдній рідині визначали шляхом зараження 9-10-денних курячих ембріонів та виражали в $Lg EID_{50/0,2}$ мл. Реакцію гемаглютинації проводили за загальноприйнятою методикою.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. При виділенні протеази з легенів здорових мишей та її

очищенні на ДЕАЕ-целюлозі спочатку ми отримали надто низький вихід ізоферментів трипсиноподібної протеази, якими важко маніпулювати. Тому перш за все потрібно було вирішити питання збільшення виходу протеази. Для цього на один дослід ми брали 100 тварин. Як видно з таблиці 1, збільшення кількості мишей та застосування ультразвуку і тритону X-100 підвищило вихід трипсиноподібної протеази в 4 рази. При очищенні методом іонообмінної хроматографії було отримано 6 піків ізоферментів із легенів здорових білих мишей і 2 піки із заражених, очищених від баластного білка від 65,00 до 99,98 % (табл. 2 і 3).

З легенів заражених мишей виділено тільки 5-й і 6-й ізоферменти. Перших 4-х піків трипсиноподібної протеази не виявляли при очищенні, мабуть, тому, що піки протамін-розщеплювальної активності зникали в період максимального розвитку грипозної інфекції. Як видно з таблиць 4 і 5, питома протеолітична активність на 1 мг білка в контролі й досліді різко зростала, порівняно з початковим матеріалом. Винятком був 6-й ізофермент, виділений із легенів здорових білих мишей. При порівнянні питомої протео-

літичної активності 6-о ізоферменту легенів здорових та інфікованих тварин виразно відзначалось збільшення протеази в матеріалі, одержаному з легенів інфікованих мишей. Найвищу питому протеолітичну активність мав 2-й ізофермент, виділений із неуражених легенів.

При додатковому очищенні піків із протеолітичною активністю із здорових легенів методом діалізу, зменшувалась активність протеази (табл. 6), що, мабуть, пов'язано з частковою інактивацією внаслідок знесолювання. Після ліофільного висушування ізоферментів протеолітична активність зберігалась.

Таким чином, нам вдалось виділити з легенів здорових мишей трипсиноподібну протеазу, яку, за допомогою іонообмінної хроматографії було поділено на 6 піків із високою протеолітичною активністю. З легенів інфікованих тварин одержано тільки 2 ізоферменти. Досліди продовжуються.

ВИСНОВКИ. 1. З легенів білих мишей виділено протеазу трипсиноподібного типу. Застосування ультразвуку та тритону X-100 збільшувало вихід трипсиноподібної протеази.

Таблиця 1 – Активність трипсиноподібної протеази при різних умовах її виділення

Назва матеріалу	Активність протеаз (ΔE_{508})			
	Досліди			
	1	2	3	4
Початковий гомогенат легенів	0,105	–	0,250	0,170
Супернатант після центрифугування і обробки ультразвуком	0,480	0,100	0,770	0,740
Осад після обробки тритоном X-100 і ультразвуком	0,100	0,160	0,920	0,225

Таблиця 2 – Очищення на ДЕАЕ-целюлозі трипсиноподібної протеази з легенів здорових мишей

№ фракцій	№ піків	Питома протеолітична активність (на 1 мг білка)	% виходу протеази	% очищення за вмістом білка
33	1	65923,3	3,200	96,80
53	2	128846,2	0,930	99,70
65	3	34064,6	1,616	98,38
75	4	61538,4	2,080	97,92
121-130	5	50153,8	0,183	99,98
161-189	6	1210,7	35,100	64,69

Таблиця 3 – Очищення на ДЕАЕ-целюлозі трипсиноподібної протеази з легенів заражених мишей

№ фракцій	№ піків	Питома протеолітична активність на 1 мг білка	% виходу протеази	% очищення за білком
111-114	5	3,098	0,88	99,12
140-175	6	5,789	4,98	95,02

2. При очищенні на ДЕАЕ-целюлозі трипсиноподібну протеазу легень здорових білих мишей було поділено на 6 піків із високою протеолітичною активністю. З легень тварин, інфікованих вірусом грипу А, виділено тільки 2 ізоферменти (5-й і 6-й).

3. Доочищення ізоферментів трипсиноподібної протеази методом діалізу призводило до зниження протеолітичної активності.

4. Після ліофільного висушування протеолітична активність ізоферментів трипсиноподібної протеази зберігалась.

Таблиця 4 – Активність протеази і вміст білка в гомогенаті легень здорових мишей і в окремих хроматографічних піках після очищення на ДЕАЕ-целюлозі

Етапи очищення		Об'єм, мл	Білок, мг/мл	Загальний білок	Активність (E ₅₀₈)	Питома протеолітична активність (на 1 мг білка)	Загальна протеолітична активність	Вихід активності	Коефіцієнт очищення протеази
Супернатант після центрифугування, обробки ультразвуком та тритоном X-100 і діалізу		100,0	6,557	655,70	0,430	0,065	43,00		
№ піку в іонообмінній хроматографії	№ фракції								
1	(33)	7,5	0,028	0,21	0,120	4,285	0,90	2,09	6593,2
2	(53)	7,5	0,004	0,03	0,335	83,750	2,51	5,84	128846,2
3	(65)	7,5	0,007	0,052	0,155	22,142	1,16	2,70	34064,6
4	(75)	7,5	0,009	0,057	0,360	40,000	2,70	6,28	61538,4
5	(121-130)	150,0	0,012	1,80	0,392	32,600	58,80	136,74	50153,8
6	(161-189)	450,0	0,512	230,4	0,403	0,787	181,35	421,74	1210,7

Таблиця 5 – Активність протеази і вміст білка в гомогенаті легень заражених вірусом грипу мишей і в окремих хроматографічних піках після очищення на ДЕАЕ-целюлозі

Етапи очищення		Об'єм, мл	Білок, мг/мл	Загальний білок	Активність (E ₅₀₈)	Питома протеолітична активність (на 1 мг білка)	Загальна протеолітична активність	Вихід активності	Коефіцієнт очищення протеази
Супернатант після центрифугування, обробки ультразвуком та тритоном X-100 і діалізу		60,0	4,62	277,20	0,242	0,052	14,52		
№ піку в іонообмінній хроматографії	№ фракції								
5	(111-114)	150,0	0,61	2,44	0,189	3,098	7,56	52,00	5957,6
6	(140-175)	450,0	0,076	13,83	0,440	5,789	80,08	551,50	11132,6

Таблиця 6 – Протеолітична активність в піках ізоферментів після додаткового очищення методом діалізу

№ ізоферментів	Об'єм, мл	Суша вага, мг	Активність протеази		E ₅₀₈ після ліофільного висушування
			до діалізу (E ₅₀₈)	після діалізу (E ₅₀₈)	
1	25,0	-	0,120	-	-
2	20,0	-	0,335	0,182	-
3	20,0	31	0,155	0,107	-0,040
4	20,0	11	0,360	0,242	0,025
5	150,0	-	0,392	0,142	0,355
6	450,0	155	0,403	0,295	0,105

ЛІТЕРАТУРА

1. Веремеенко К.М. Ферменты протеолиза и их ингибиторов в медицинской практике // В кн.: Методы определения активности протеаз и их ингибиторов. – 1971. – С. 184-199.
2. Вовчук С.В. Определение активности протеолитических ферментов в зерне злаковых культур // Сб. "Биохимические методы исследования селекционного материала". – Одесса, 1979. – С. 67-69.
3. Жебрун А.Б., Полянская Н.Ю., Носков Ф.С., Фридман Э.Ю. Этиология и специфическая профилактика гриппа А. – М.: Наука, 1982. – 81 с.
4. Полянская Н.Ю. Эффективность методов очистки и контроля инактивированных гриппозных вакцин: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Л., 1984. – 20 с.
5. Ровнова З.И., Косяков П.Н. Исследования свойств антигенов хозяина в структуре миксовирусов // Вопр. вирусол. – 1966. – № 4. – С. 413-417.
6. Bosch F.X., Garten W., Klenk H.-D., Rott R. Proteolytic cleavage of influenza virus hemagglutinin. Primary structure of the connecting peptide between H₁A₁ and H₁A₂ determines proteolytic cleavability and pathogenicity of avian influenza viruses // Virology. – 1981. – **11**. – P. 725-735.
7. Lowry W.C. Protein measurement with the Folein reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – **5**. – P. 265-268.

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА ТРИПСИНОПОДОБНОЙ ПРОТЕАЗЫ ИЗ ЛЕГКИХ БЕЛЫХ МЫШЕЙ

В.А. Дивоча, С.Ю. Сова, В.Н. Михальчук
ОДЕССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

Резюме

Наличие в вирусных препаратах антигенных компонентов клетки-хозяина играет значительную роль в процессах репликации вируса. Возникла насущная необходимость идентифицировать и описать характеристики протеаз для дальнейшего понимания вирусного патогенеза и противовирусной стратегии. Во время исследований из легких здоровых и инфицированных гриппом белых мышей было выделено протеазу трипсиноподобного типа. При ее очистке методом ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе трипсиноподобную протеазу здоровых мышей было разделено на 6 пиков, которые обладали высокой протеолитической активностью. С легких животных, инфицированных вирусом гриппа А, выделено только два изофермента.

Доочистка изоферментов методом диализа приводила к снижению протеолитической активности. После лиофильной сушки изоферментов трипсиноподобной протеазы сохранялась протеолитическая активность.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: вирус гриппа, легкие, трипсиноподобная протеаза, изоферменты, очистка ферментов.

ELIMINATION AND PURIFICATION OF TRYPSIN-SIMILAR PROTEASE FROM THE LUNGS OF WHITE RATS

V.A. Divocha, S.Yu. Sova, V.M. Mykhalchuk
ODESA STATE MEDICAL UNIVERSITY

Summary

The availability of antigenic components of host cell in viral preparations plays a considerable role in the processes of virus replication. For further comprehension of viral pathogenesis and antiviral strategy it is necessary to identify and describe the characteristics of proteases. During the investigations of the lungs of healthy and influenza-infected white rats there has been eliminated the trypsin-similar protease. In the process of its purification by means of ionometabolic chromatography on DEAE-cellulose trypsin-similar protease of healthy rats was divided into 6 peaks with high proteolytic activity. There have been eliminated only 2 isoenzymes from the lungs of influenza-infected animals.

Additional purification of isoenzymes by means of dialysis resulted in decrease of proteolytic activity. After lyophilic drying of trypsin-similar protease's isoenzymes the proteolytic activity remained.

KEY WORDS: influenza virus, lungs, trypsin-similar protease, isoenzymes, enzyme purification.

Отримано 19.04.2001 р.

Адреса для листування: В.А. Дівоча, Одеський державний медичний університет, пров. Валівський, 2, 65026, Одеса, Україна.

СИНТЕЗ НОВИХ СИМЕТРИЧНИХ ДІАМІДІВ МАЛОНОВОЇ КИСЛОТИ ЯК ПОТЕНЦІЙНИХ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН

П.О. Безуглий, В.А. Георгіянц, Л.О. Перехода, Н.Ю. Бевз, А.В. Таран
НАЦІОНАЛЬНА ФАРМАЦЕВТИЧНА АКАДЕМІЯ УКРАЇНИ, ХАРКІВ

Термолізом суміші діетилмалонату та ароматичних амінів синтезовано нові діаміди малонОВОЇ кислоти. Будову одержаних сполук доведено методами УФ- та ІЧ-спектроскопії. Чистоту підтверджено методом тонкошарової хроматографії. Первинний фармакологічний скринінг показав, що синтезовані сполуки є антагоністами протисудомної дії коразолу. Вивчено залежність гострої токсичності та активності синтезованих речовин від замісника в амідній функції при збереженні незаміщеної метиленової групи. Оптимальною умовою для прояву протисудомних властивостей є присутність в амідній функції молекули залишку адамантанзаміщеного тіазолу.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: синтез, аміди, малонОВА кислота.

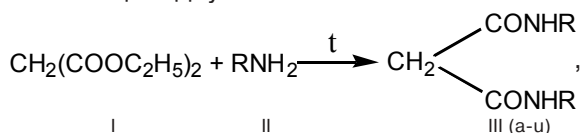
ВСТУП. Продовжуючи дослідження, які проводять на кафедрі фармацевтичної хімії НФАУ з пошуку нових біологічно активних речовин, ми звернули увагу на симетричні діаміди малонОВОЇ кислоти. Більшість із них чинять вплив на ЦНС [5], а також мають проти-запальні та анальгетичні властивості [4]. Враховуючи широкий спектр їх біологічної активності поряд із простотою синтетичних методик та доступністю хімічної сировини, вважаємо доцільним розширити коло діанлідів малонОВОЇ кислоти та вивчити можливу залежність фармакологічної активності від замісника в амідній функції при збереженні незаміщеної метиленової групи. Зараз проводять дослідження з вивчення біологічних властивостей похідних вуглеводнів каркасної будови, насамперед адамантану, як найбільш доступного з них. Відомо, що похідні адамантану (мідантан, глудантан) застосовують як протисудомні та антивірусні засоби. Введення в молекули сполук, що досліджуються, об'ємного гідрофобного адамантильного радикала в ряді випадків призводить до посилення протисудомних властивостей [1]. Практичний інтерес викликає також поєднання в одній молекулі трьох фармакофорів: залишку малонОВОЇ кислоти, тіазольного циклу та адамантильного радикала.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Нами раніше встановлено [4], що синтез цільових продуктів можна здійснити різними методами: ацилю-

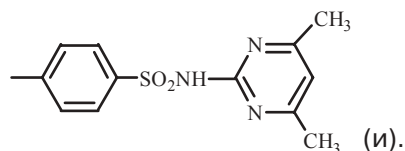
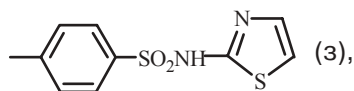
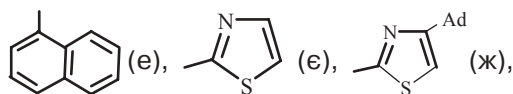
© П.О. Безуглий – д.ф.н., проф., В.А. Георгіянц – к.ф.н., Л.О. Перехода, Н.Ю. Бевз – к.ф.н., А.В. Таран – к.ф.н., 2001.

ванням ароматичних амінів дихлорангідридом малонОВОЇ кислоти або взаємодією подвійного надлишку аміну з діетилмалонатом. Обидва способи мають свої переваги та недоліки. Враховуючи, що перший вимагає попереднього одержання ацилюючого агента дихлорангідриду малонОВОЇ кислоти, що знижує вихід у перерахунку на малонОВУ кислоту, ми синтезували симетричні діаміди термолізом подвійного надлишку амінів (I) з діетилмалонатом (II).

Реакція відбувається за схемою:



де R = ^I-C₆H₂-Br-2,4,6 (а), ^{II}-C₆H₄COOC₂H₅ (б), ^{III}(а-у)
-C₆H₄SO₂NH₂ (в), -C₆H₄SO₂NHCONH₂ (г),
-C₆H₃-CH₃-3,4 (д),



Ацилювання таким способом арил- та гетериламінів здійснюють шляхом сплавлення вихідних речовин на металевій бані при

температурі 180-200 °С протягом 2-3 год до припинення виділення спирту. Виходи цільових продуктів за цим методом можна вважати задовільними. Однак слід відзначити, що недоліком проведення реакції при високій температурі без розчинника є осмолювання продуктів реакції. Синтезовані сполуки залежно від розчинності кристалізують із різних розчинників: етанолу, ізопропанолу, диметилформаміду або їх суміші. Після перекристалізації синтезовані сполуки є безбарвними кристалічними пластинками з чіткими температурами плавлення (табл. 1).

Будову отриманих сполук доведено за допомогою інструментальних методів аналізу. УФ-спектри отриманих речовин характеризуються наявністю одного або двох максимумів високої інтенсивності в ділянці 234-274 нм, яка належить до π - π електронного переходу, локалізованого на (арил) гетериламідному хромофорі (табл. 1), та відсутністю коливної структури, що зумовлено здебільшого природою замісників в амідному залишку.

Результати спектральних досліджень в ІЧ-ділянці свідчать про те, що в спектрах синтезованих сполук відсутні смуги поглинання складноєфірної групи, а в ділянці близько 1650 cm^{-1} знаходиться смуга валентних коливань "амід-1" [2]. Чистоту отриманих речовин підтвердили методом тонкошарової хроматографії.

УФ-спектри синтезованих сполук знято на приладі "Specord M-40" в етанолі в межах концентрацій від $1 \cdot 10^{-3}$ до $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л. ІЧ-спектри одержаних сполук записано на приладі "Specord-M-80" в таблетках KBr, концентрація речовини – 1 %. Значення R_f визначали на пластинках "Silufol UV-254" в системі розчинників "бутанол – концентрована оцтова кислота – вода" (40:10:1), проявник – пари йоду. Дані елементного аналізу відповідають розрахованим.

Отримання 2,4,6-трибромдіаміду малонової кислоти. До 0,98 г (0,003 моль) трибром-

аніліну додають 0,24 мл (0,0015 моль) діетилмалонату. Нагрівають на металевій бані протягом 2-3 год при температурі 180 °С до припинення виділення спирту. Сухий залишок перекристалізують із суміші диметилформаміду та ізопропанолу. Вихід – 0,5 г (45,87 %).

Сполуки IIIa-и отримано аналогічно.

Вивчення токсичності синтезованих сполук було проведено на інтактних білих мишах обох статей масою 20-25 г при внутрішньочеревному введенні речовин у вигляді водних суспензій, солюбілізованих твіном-80. Смертність встановлювали через 24 год й оцінювали за тестом середньосмертельної дози (LD_{50}).

Протисудомну активність вивчали на білих щурах лінії Вістар масою 150-180 г на моделі судом, викликаних коразолом. Контрольні та дослідні групи містили по 5 тварин. Коразол вводили в дозі 100 мкг/кг через годину після введення дослідних сполук [3]. Критерієм оцінки протисудомного ефекту була зміна характеру судомних нападів. Захищеними від дії судомних отрут вважали всіх тварин, у яких були тільки окремі судоми або слабка клонічна фаза судом тривалістю менше 5 хв. Щурам контрольної, групи замість синтезованих речовин, вводили еквівалентну кількість розчину твіну-80. Як препарат порівняння було використано аналог за дією та структурою – фенобарбітал.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Усі дослідні речовини за класифікацією Сидорова є малотоксичними. Первинна фармакологічна оцінка показала, що всі речовини, які вивчаються, за винятком діамідів IIIз та IIIи, мають стійкий захисний ефект щодо розвитку коразолових судом, що проявляється скороченнями основних фаз судомного процесу, порівняно з контролем. Найбільш ефективним у цій серії сполук був діамід малонової кислоти,

Таблиця 1 – Симетричні діаміди малонової кислоти загальної формули $\text{CH}_2(\text{CONHR})_2$

Сполука	Вихід, %	Температура плавлення, °С	R_f	УФ-спектри		ІЧ-спектри $\nu_{\text{C=O}}$ "амід-1"
				λ_{max} , нм	Ig e	
IIIa	46	268-270	0,58	250	3,99	1600;1684
IIIб	54	174-175	0,63	269	3,17	1630;1664
IIIв	56	255-257	0,49	252	2,67	1610;1652
IIIг	62	258-260	0,67	234	2,71	1624;1660
IIIд	38	160-162	0,39	248	4,51	1620;1668
IIIе	21	180-182	0,48	262	2,89	1630;1690
IIIє	19	246-248	0,45	274	4,41	1612;1672
IIIж	79	244-246	0,55	248	4,51	1600;1672
IIIз	87	188-190	0,57	269	3,17	1612;1628
IIIи	82	246-248	0,58	274	4,41	1600;684

Примітка. Значення R_f наведено в системі "бутанол – концентрована оцтова кислота-вода" (40:10:1).

замісник в амідній функції якого є похідним адамантану.

ВИСНОВКИ. 1. Взаємодією арил- та гетерил-амінів із діетилмалонатом було синтезовано нові діаміди маленової кислоти. Проведено дослідження їх фізико-хімічних властивостей.

2. Будову отриманих сполук доведено ме-

тодами УФ- та ІЧ-спектроскопії, чистоту підтверджено методом тонкошарової хроматографії.

3. Первинна фармакологічна оцінка показала, що для речовин, що вивчаються, характерна протисудомна активність. Найбільш ефективним був діамід маленової кислоти, замісник в амідній функції якого є похідним адамантанзаміщеного тiazолу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Безуглий П.О., Алексеєва Т.В., Тріскач В.И та ін. Вивчення протисудомної активності похідних 4-R-5-R₁-тіазоліл-2-амідів маленової та щавлевої кислот // Укр. фармац. акад. – Харків, 1994. 9 с. – Деп. ДМТБ України 08.09.94, № 1837 – Ук 94.

2. Браун Д., Флорйд А., Сейнсбери М. Спектроскопия органических веществ: Пер. с англ. – М: Мир, 1992. – 300 с.

3. Гацуря В.В. Методы первичного фармакологического исследования биологически активных

веществ. – М.: Медицина, 1974. – 143 с.

4. Георгіянц В.А., Рахімова М.В., Безуглий П.О., та ін. Діаніліди маленової кислоти – нова група нестероїдних протизапальних засобів // Фармац. журн. – 1998. – № 1. – С. 78-81.

5. Георгіянц В.А., Рахімова М.В., Гладченко О.В. Синтез, спектральні характеристики та вплив на центральну нервову систему діанілідів маленової кислоти // Вісн. фармац. – 1998. – 1, № 17. – С. 11-14.

СИНТЕЗ НОВЫХ СИММЕТРИЧНЫХ ДИАМИДОВ МАЛОНОВОЙ КИСЛОТЫ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

П.А. Безуглый, В.А. Георгиянц, Л.А. Перехода, Н.Ю. Бевз, А.В. Таран
НАЦИОНАЛЬНАЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ АКАДЕМИЯ УКРАИНЫ, ХАРЬКОВ

Резюме

Термолизом смеси диэтилмалоната и ароматических аминов синтезировано новые диамиды маленовой кислоты. Структуру полученных соединений доказано методами УФ- и ИК-спектроскопии. Чистоту подтвердили методом тонкослойной хроматографии. Первичный фармакологический скрининг показал, что синтезированные соединения являются антагонистами противосудорожного действия коразола. Была изучена зависимость острой токсичности и активности синтезированных веществ от заместителя в амидной функции при сохранении незамещенной метиленовой группы. Оптимальным условием для проявления противосудорожных свойств является присутствие в амидной функции молекулы остатка адамантанзамещенного тiazола.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: синтез, амиды, маленовая кислота.

SYNTHESIS OF NEW SYMMETRIC DIAMIDES OF MALONIC ACID AS POTENTIAL BIOLOGICALLY ACTIVE AGENTS

P.A. Bezugly, V.A. Georgiyants, L.A. Perekhoda, N.Yu. Bevz, A.V. Taran
UKRAINIAN NATIONAL ACADEMY OF PHARMACY, KHARKIV

Summary

By means of thermolysis of diaethylmalonate and aromatic amines mixture the new diamides of malonic acid have been synthesized. The structure of obtained agents was confirmed by spectral methods (UV-, IR-spectroscopy). Their origin was proved by thin-layer chromatography. According to pharmacological screening the synthesized agents are antagonists of anti-convulsive activity of corasol. It was learned that the acute toxicity and activity of synthesized agents depend on the substitutor in amide function under condition of keeping of non-substituted methylen group. The presence of adamantansubstituted thiazole in the molecule is the optimal condition for display of anticonvulsive activity.

KEY WORDS: synthesis, amides, malonic acid.

Отримано 19.04.2001 р.

Адреса для листування: В.А. Георгіянц, вул. Пушкіна, 53, Харків, 61002, Україна.