

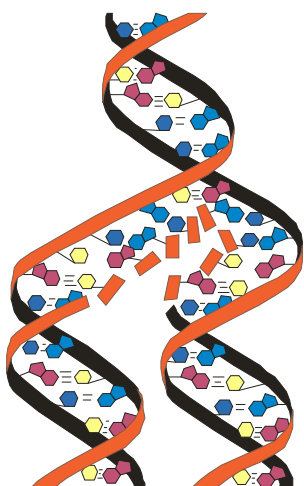
Академія медичних наук України

Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця

МЕДИЧНА ХІМІЯ

НАУКОВИЙ ЖУРНАЛ



*Academy of Medical Sciences of Ukraine
Ternopil State Medical University by I.Ya. Horbachevsky
National Medical University by O.O. Bogomolets*

MEDICAL CHEMISTRY

SCIENTIFIC JOURNAL

4 TOM 11
2009

- ❖ *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*
- ❖ *Pathochemistry of Hereditary Diseases*
- ❖ *Pathochemistry of Extremal States*
- ❖ *Biochemistry in Surgical Clinics*
- ❖ *Neurochemistry and Pathochemistry 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*

МЕДИЧН ХІМІЯ

Науковий журнал

MEDICAL CHEMISTRY

Scientific Journal

ISSN 1681-2557

Виходить з 1999 року
Published since 1999

Свідоцтво про державну реєстрацію: серія KB № 3647
Certificate of state registration: series KB № 3647

Передплатний індекс: 22869
Subscription index: 22869

Відповідно до постанови Президії ВАК України № 1-05/7 від 09.06.1999 р. 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.

Журнал "Медична хімія" акредитований науково-видавничою радою Президії АМН України (лист № 02-17/1341 від 25.10.2001 р.).

Рекомендовано до видання вченою радою Тернопільського державного медичного університету імені І.Я. Горбачевського (протокол № 8 від 24 листопада 2009 р.).

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

EDITORIAL OFFICE ADDRESS:
Journal "Medical Chemistry"
Publishing House "Ukrmedknyga"
Maidan Voli, 1
46001, Ternopil
UKRAINE

Tel.: (0352) 43-49-56
(0352) 52-80-09
Fax: (0352) 52-41-83
<http://www.tdmu.edu.te.ua>

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"
© Scientific Journal "Medical Chemistry"

Зміст

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

- Н.В. Заїчко, Н.О. Пентюк, А.В. Мельник, О.І. Штатко, І.І. Андрушко* (Вінниця) УТВОРЕННЯ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ В ОРГАНАХ ЩУРІВ 7
- І.В. Українець, В.В. Кравцова, А.О. Ткач, О.В. Моспанова* (Харків, Рубіжне) ПОШУК НОВИХ МІСЦЕВОАНЕСТЕЗУВАЛЬНИХ ЗАСОБІВ У РЯДІ ГІДРОХЛОРИДІВ N-R-АМІДІВ 1-ГІДРОКСИ-3-ОКСО-5,6-ДИГІДРО-3H-ПІРОЛО[3,2,1-ij]ХІНОЛІН-2-КАРБОНОВОЇ КИСЛОТИ 14
- А.Г. Каплаушенко, О.І. Панасенко, Є.Г. Книш, Т.О. Панасенко, О.О. Свінтозельський* (Запоріжжя) АНАЛЬГЕТИЧНА АКТИВНІСТЬ ТІОПОХІДНИХ 5-R₁-4-R₂-1,2,4-ТРИАЗОЛ-3-ТІОНІВ 19
- О.А. Євтіфеева, К.І. Проскуріна, В.А. Георгіянти* (Харків) ВАЛІДАЦІЯ ТИТРИМЕТРИЧНОЇ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ РОЗЧИНІВ ПІЛОКАРПІНУ ГІДРОХЛОРИДУ АПТЕЧНОГО ВИГОТОВЛЕННЯ 24
- С.А. Морхунцова* (Запоріжжя) ВПЛИВ S-ЗАМІЩЕНИХ ХІНАЗОЛІНУ НА ПОКАЗНИКИ ОКСИДОВАЛЬНОЇ МОДИФІКАЦІЇ БІЛКА *IN VITRO* ЗА УМОВ ТОКСИЧНОЇ ДІЇ АКТИВНИХ ФОРМ NO 29
- Ю.В. Тимошик, М.М. Васенда, М.М. Михалків, В.В. Петренко, Т.А. Грошовий* (Запоріжжя, Тернопіль) РОЗРОБКА СПОСОБУ ТА ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИК КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ МАГНІЮ АСПАРАГІНАТУ В ТАБЛЕТКАХ 35
- С.П. Пасевич* (Чернівці) ВИВЧЕННЯ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ПЛАЗМИ КРОВІ ЩУРІВ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ ГОСТРІЙ НИРКОВІЙ НЕДОСТАТНОСТІ ЗА УМОВ ВПЛИВУ ХРОНІЧНОЇ ГІПОБАРИЧНОЇ ГІПОКСІЇ 39
- І.П. Кузьмак, І.М. Клішч* (Тернопіль) СТАН БІЛКОВОГО ОБМІНУ В СТАТЕВОНЕЗРІЛИХ ЩУРІВ ЗА УМОВ ТОКСИЧНОГО УРАЖЕННЯ БЛІДОЮ ПОГАНКОЮ В ЕКСПЕРИМЕНТІ 43
- А.В. Юрженко* (Київ) ВПЛИВ КОРАРГІНУ НА ЛІПОПЕРОКСИДАЦІЮ РОТОВОЇ РІДИНИ У ПАЦІЄНТІВ З ГЕНЕРАЛІЗОВАНИМ ПАРОДОНТИТОМ 48
- О.О. Чернухіна* (Тернопіль) ПОКАЗНИКИ УРАЖЕННЯ ПЕЧІНКИ І НИРОК ПРИ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТИ ТА ПРИЗНАЧЕННІ МОДУЛЯТОРІВ СИНТЕЗУ ОКСИДУ АЗОТУ 52
- С.М. Андрейчин, І.І. Ганьбергер* (Тернопіль) ОБГРУНТУВАННЯ ЗАСТОСУВАННЯ ІНДУКТОРА ЕНДОГЕННОГО ІНТЕРФЕРОНОУТВОРЕННЯ У ХВОРИХ НА ОСТЕОАРТРОЗ У ПОЄДНАННІ З ХРОНІЧНИМИ ОБСТРУКТИВНИМИ ЗАХВОРЮВАННЯМИ ЛЕГЕНЬ 56
- І.Б. Чень* (Тернопіль) ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК МІЖ ГРУПАМИ КРОВІ АВО ТА БІЛКОВИМ СКЛАДОМ ЇХ КРОВІ В ОНКОЛОГІЧНИХ ХВОРИХ 60

КОНФЕРЕНЦІЯ

- О.Б. Кучменко, Д.М. Петухов, І.Н. Євстратова, Н.М. Васілінчук, Л.С. Мхітарян, Г.В. Донченко* (Київ) ПОКАЗНИКИ БІОЕНЕРГЕТИЧНИХ ПРОЦЕСІВ І СТАН ПРО- І АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМ В МІТОХОНДРІЯХ СЕРЦЯ СТАРИХ ЩУРІВ ЗА УМОВ ВВЕДЕННЯ КОМПЛЕКСУ ПОПЕРЕДНИКІВ ТА МОДУЛЯТОРА БІОСИНТЕЗУ УБІХІНОНУ 64

Contents

ORIGINAL INVESTIGATIONS

- N.V. Zaichko, N.O. Pentiuk, A.V. Melnyk, O.I. Shtatko, I.I. Andrushko* (Vinnytsia) PRODUCTION OF HYDROGEN SULFIDE IN ORGANS OF RATS 7
- I.V. Ukrainets, V.V. Kravtsova, A.O. Tkach, O.V. Mospanova* (Kharkiv, Rubizhne) SEARCH OF NEW LOCAL ANESTHETICS IN THE RANGE OF 1-HYDROXY-3-OXO-5,6-DIHYDRO-3H-PYRROLO[3,2,1-ij]QUINOLINE-2-CARBOXYLIC ACID N-R-AMIDES HYDROCHLORIDES 14
- A.H. Kaplaushenko, O.I. Panasenko, Ye.H. Knysh, T.O. Panasenko, O.O. Svintozelsky* (Zaporizhzhya) ANALGETIC ACTIVITY OF 5-R₁-4-R₂-1,2,4-TRIAZOL-3-THIONS THIODERIVATIVES 19
- O.A. Yevtifeyeva, K.I. Proskurina, V.A. Georgiyants* (Kharkiv) VALIDATION OF TITRIMETRIC METHOD OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF PILOCARPINE HYDROCHLORIDE IN SOLUTIONS OF PHARMACY PRODUCTION 24
- S.A. Morhuntsova* (Zaporizhzhya) INFLUENCE OF S-SUBSTITUTED QUINAZOLINES ON *IN VITRO* PROTEIN OXIDATIVE MODIFICATION PARAMETERS IN CONDITIONS OF TOXIC ACTION OF NO ACTIVE FORMS 29
- Yu.V. Tymoshyk, M.M. Vasenda, M.M. Mykhalkiv, V.V. Petrenko, T.A. Hroshovy* (Zaporizhzhya, Ternopil) ELABORATION OF THE WAY AND VALIDATION OF METHOD OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF MAGNIUM ASPARAGINATUM IN TABLETS 35
- S.P. Pasevych* (Chernivtsi) STUDY OF PROOXIDANT-ANTIOXIDANT FEATURES OF RAT BLOOD PLASMA AT EXPERIMENTAL ACUTE RENAL INSUFFICIENCY UNDER THE INFLUENCE OF CHRONIC HYPOBARIC HYPOXIA 39
- I.P. Kuzmak, I.M. Klishch* (Ternopil) THE STATE OF PROTEIN METABOLISM IN IMMATURE RATS UNDER CONDITIONS OF TOXIC DAMAGE BY AMANITA PHALLOIDES IN EXPERIMENT 43
- A.V. Yurzenko* (Kyiv) EFFECT OF CORARGINE ON LIPID PEROXIDATION OF ORAL LIQUID IN PATIENTS WITH PERIODONTITIS 48
- O.O. Chernukhina* (Ternopil) SIGNS OF LIVER AND KIDNEY DAMAGE IN DIABETES MELLITUS AND ADMINISTRATION OF NITRIC OXIDE SYNTHESIS MODULATORS 52
- S.M. Andreychyn, I.I. Hanberher* (Ternopil) BACKGROUNDS OF ENDOGENOUS INTERFERON INDUCTION APPLICATION FOR PATIENTS WITH OSTEOARTHRITIS IN COMBINATION WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE 56
- I.B. Chen* (Ternopil) THE CORRELATION BETWEEN THE BLOOD GROUPS ABO AND THE BLOOD ALBUMIN IN ONCOLOGICALLY SICK PEOPLE 60

CONFERENCE

- O.B. Kuchmenko, D.M. Petukhov, I.N. Yevstratova, N.M. Vasilinchuk, L.S. Mkhitarjan, H.V. Donchenko* (Kyiv) EFFECT OF ADMINISTRATION OF PRECURSORS AND MODULATOR OF COENZYME Q BIOSYNTHESIS ON STATUS OF BIOENERGETICAL PROCESSES, PRO- AND ANTIOXIDANT SYSTEMS IN OLD RATS' HEART MITOCHONDRIA 64

Ю.Т. Салига (Львів) ПОТЕНЦІЙНА НЕЙРОТОКСИЧНІСТЬ ХЛОРПІРИФОСУ І СПОСОБИ ЇЇ ВИВЧЕННЯ	69	Yu. T. Salyha (Lviv) POTENTIAL NEUROTOXICITY OF CHLORPYRIFOS AND METHODS OF ITS INVESTIGATION
В.А. Бондаренко, В.Н. Зовський, С.А. Наконечна (Харків) ВПЛИВ ОКСИЕТИЛЬОВАНИХ АЛКІЛ- ТА ІЗОНОНІЛФЕНОЛІВ НА ОБМІН КУПРУМУ Й АКТИВНІСТЬ ЦЕРУЛОПЛАЗМІНУ В ЕКСПЕРИМЕНТІ НА ГОМОІОТЕРМНИХ ТВАРИНАХ	73	V.A. Bondarenko, V.N. Zovsky, S.A. Nakonechna (Kharkiv) INFLUENCE OF OXYETHYLIZED ALKYL- AND ISONONILPHENOLS UPON CUPRUM IONS METABOLISM AND ACTIVITY OF CERULOPLASMIN IN EXPERIMENT ON WARM-BLOODED ANIMALS
І.В. Бродяк, М.І. Здіорук, М.Л. Барська, О.І. Вовк, Н.О. Сибірна (Львів) ЛЕКТИНОЦИТОХІМІЧНИЙ АНАЛІЗ СІАЛОВІСНИХ ГЛІКОПРОТЕЇНІВ МЕМБРАН МОНОНУКЛЕАРНИХ ЛЕЙКОЦИТІВ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ЗА УМОВ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 1-ГО ТИПУ	76	I.V. Brodyak, M.I. Zdiuruk, M.L. Barska, O.I. Vovk, N.O. Sybirna (Lviv) LECTINCYTOCHEMICAL ANALYSIS OF MONONUCLEAR LEUCOCYTES PLASMATIC MEMBRANES SIALIC-CONTAINING GLYCOPROTEIN OF PERIPHERAL BLOOD UNDER TYPE 1 DIABETES MELLITUS
М.В. Князева, А.В. Прокопюк, Т.Д. Павлова (Харків) ПРО МОЖЛИВІСТЬ ВИКОРИСТАННЯ РІВНЯ ЦИТОКІНІВ У МОНІТОРИНГУ ЗА ВПЛИВОМ НЕОАД'ЮВАНТНОЇ ПОЛІХЕМОТЕРАПІЇ У ХВОРИХ НА РАК ЯЄЧНИКІВ	80	M.V. Knyazyeva, A.V. Prokopyuk, T.D. Pavlova (Kharkiv) ABOUT POSSIBILITY OF CYTOKINE LEVEL USING FOR EFFECT OF NEOADJUVANT PROCESS MONITORING AT PATIENTS WITH OVARIAN CANCER
І.І. Торяник, Н.Г. Попова (Харків) ГІПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМІЯ ЯК ОДИН ІЗ НАСЛІДКІВ ВІРУСНО- БАКТЕРІАЛЬНОЇ ІНФЕКЦІЇ У ДІТЕЙ	83	I.I. Torianyk, N.H. Popova (Kharkiv) HYPERCHOLESTEROLEMIA AS ONE OF AFTER-EFFECTS OF VIRAL-BACTERIAL INFECTION IN CHILDREN
О.П. Шатова, Є.В. Хомутов, Т.О. Журавель, О.В. Богатирьова, З.М. Скоробогатова, І.І. Зінкович (Донецьк) ВПЛИВ ЛАКТАТУ ЛІТІУ НА ГЕМОЛІЗ ЕРИТРОЦИТІВ	86	O.P. Shatova, Ye.V. Khomutov, T.O. Zhuravel, O.V. Bohatiryova, Z.M. Skorobohatova, I.I. Zinkovych (Donetsk) IMPACT OF LITHIUM LACTATE ON HEMOLYSIS OF RED BLOOD CELLS
О.Г. Короткий, Т.П. Карповець, С.В. Пилипенко, Т.В. Берегова, Л.І. Остапченко (Київ) КОНЦЕНТРАЦІЯ ФАКТОРА НЕКРОЗУ ПУХЛИН АЛЬФА В СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ З ТРИВАЛОЮ ГІПОАЦИДНІСТЮ ЗА УМОВ ВВЕДЕННЯ МУЛЬТИПРОБІОТИКІВ	89	O.H. Korotkiy, T.P. Karpovets, S.V. Pylypenko, T.V. Beregova, L.I. Ostapchenko (Kyiv) TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA CONCENTRATION IN BLOOD SERUM IN OF THE RATS WITH LONG-TERM HYPOACIDITY UNDER MULTIPROBIOTIC TREATMENT
М.В. Білець (Полтава) ОБҐРУНТУВАННЯ ВИКОРИСТАННЯ КАЛЬЦИТОНІНУ ДЛЯ КОРЕКЦІЇ СТРУКТУРНИХ ЗМІН В КІСТКОВІЙ ТКАНИНІ НИЖНЬОЇ ЩЕЛЕПИ ЗА УМОВ ЕМОЦІЙНОГО СТРЕСУ ТА ЙОГО ПОЄДНАННЯ З ОВАРІОЕКТОМІЄЮ	92	M.V. Bilets (Poltava) SUBSTANTIATION OF CALCITONIN USE FOR CORRECTION OF STRUCTURAL CHANGES IN BONE TISSUE OF LOWER JAW UNDER CONDITIONS OF EMOTIONAL STRESS AND ITS COMBINATION WITH OVARIECTOMY
В.І. Жуков, О.А. Наконечна, С.О. Стеценко (Харків) ВМІСТ НЕЙРОАКТИВНИХ АМІНОКИСЛОТ У ГОЛОВНОМУ МОЗКУ ЩУРІВ ЗА УМОВ ДІЇ ПРОСТИХ ПОЛІЕФІРІВ	95	V.I. Zhukov, O.A. Nakonechna, S.O. Stetsenko (Kharkiv) INFLUENCE OF SIMPLE POLYETHERS ON NEUROACTIVE AMINOACIDS CONTENTS IN BRAIN OF RATS
С.М. Охріменко, Н.Є. Панова, М.А. Журова, А.Л. Загайко (Харків) ВПЛИВ ХЛОРИДУ КОБАЛЬТУ ТА ЕКСТРАКТУ ВІНОГРАДНИХ КІСТОЧОК НА ПОКАЗНИКИ СТРЕС-РЕАКЦІЇ ТА АЗОТНОГО ОБМІНУ В ЩУРІВ	98	S.M. Okhrimenko, N.Ye. Panova, M.A. Zhurova, A.L. Zahayko (Kharkiv) INFLUENCE OF COBALT CHLORIDE AND GRAPE SEED EXTRACT ON INDICES OF STRESS-REACTION AND NITRIC METABOLISM AT RATS
Л.М. Росток, І.М. Туряниця (Ужгород) ВПЛИВ ЙОДНОЇ ЗАБЕЗПЕЧЕНОСТІ ОРГАНІЗМУ НА ФОРМУВАННЯ АМІНОКИСЛОТНИХ РЕЗЕРВІВ СИРОВАТКИ КРОВІ У БІЛИХ ЩУРІВ ПРИ ГІПЕРТЕРМІЇ	101	L.M. Rostoka, I.M. Turianytsia (Uzhhorod) INFLUENCE OF IODINE SUPPLY OF THE ORGANISM ON AMINO ACID RESERVE FORMATION IN BLOOD SERUM OF WHITE RATS UNDER HYPERTHERMIA
Л.Д. Романчук, Г.І. Фальфушинська, О.Б. Столяр (Тернопіль) ЙМОВІРНА УЧАСТЬ МЕТАЛОТІОНЕЇНІВ ЖАБИ RANA RIDIBUNDA В АНТИОКСИДАНТНОМУ ЗАХИСТІ ЗА ВПЛИВУ ІОНІВ МІДІ ТА ЦИНКУ	104	L.D. Romanchuk, H.I. Falfushynska, O.B. Stoliar (Ternopil) PROBABLE PARTICIPATION OF METALLOTHIONEINS OF FROG RANA RIDIBUNDA IN ANTIOXIDAN DEFENCE UNDER THE EFFECT OF COPPER AND ZINC IONS
В.І. Падалко, І.С. Леонова, О.В. Козлова (Харків) ВПЛИВ ХЛОРИДУ КАДМІЮ НА СТАН МОНООКСИГЕНАЗНОЇ СИСТЕМИ ТА ІНТЕНСИВНІСТЬ ОКСИДАТИВНИХ ПРОЦЕСІВ У ТКАНИНАХ ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ	107	V.I. Padalko, I.S. Leonova, O.V. Kozlova (Kharkiv) EFFECT OF CADMIUM CHLORIDE ON MONOOXYGENASE SYSTEM AND INTENSIVITY OF OXIDATIVE PROCESSES IN DIFFERENT-AGED RAT TISSUES
Б.Л. Білик, Ю.А. Ржепечський, О.С. Красовська, Н.О. Сибірна, О.В. Стасик (Львів) ОТРИМАННЯ РЕКОМБІНАНТНОГО ФЕРМЕНТУ АРГІНАЗИ І ЛЮДИНИ У ДРІЖДЖІВ ЯК ПРОТИПУХЛИННОГО ПРЕПАРАТУ	110	B.L. Bilyk, Yu.A. Rzhpetsky, O.S. Krasovska, N.O. Sybirna, O.V. Stasyk (Lviv) PRODUCTION OF THE RECOMBINANT HUMAN ARGINASE I ON THE BASIS OF YEASTS AS AN ANTITUMOR AGENT

<i>В.П. Филимоненко</i> (Харків) ТКАНИНОСПЕЦИФІЧНІ ЗМІНИ ВМІСТУ НІТРИТІВ ТА НІТРАТІВ У ЩУРІВ ЗА УМОВ РАБДОМІОЛІЗУ НА ФОНІ ПОПЕРЕДНЬОГО ВВЕДЕННЯ L-АРГІНІНУ ТА Zn-ПРОТОПОРФІРИНУ	114	<i>V.P. Fylymonenko</i> (Kharkiv) TISSUE-SPECIFIC CHANGES OF RAT NITRITES AND NITRATES CONTENT DURING RHABDOMYOLYSIS UNDER PRETREATMENT BY L-ARGININE AND Zn-PROTOPORPHYRIN
<i>І.С. Фоменко, Т.І. Бондарчук</i> (Львів) ВПЛИВ ЦОГ/ЛОГ БЛОКАТОРІВ НА ПРОЦЕСИ ЛІПОПЕРОКСИДАЦІЇ У СЛИЗОВІЙ ОБОЛОНЦІ ШЛУНКА ТА ТКАНИНИ СЕРЦЯ ЩУРІВ	117	<i>I.S. Fomenko, T.I. Bondarchuk</i> (Lviv) INFLUENCE OF COX/LOX BLOCKERS ON LIPOPEROXYDATION PROCESSES IN GASTRIC MUCOSA AND HEART TISSUE OF RATS
<i>Г.І. Фальфушинська</i> (Тернопіль) ТКАНИННА СПЕЦИФІКА АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ ТОЛЕРАНТНОГО ДО ГІПОКСІЇ ОРГАНІЗМУ	121	<i>H.I. Falfushynska</i> (Ternopil) TISSUE SPECIFICITY OF ANTIOXIDANT DEFENCE IN TOLERANT TO HYPOXIA ORGANISM
<i>Н.С. Хопта, Г.М. Ерстенюк</i> (Івано-Франківськ) СТАН МІНЕРАЛЬНОГО МАТРИКСУ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ТВАРИН ЗА УМОВ ПОЄДНАНОЇ ДІЇ КСЕНОБІОТИКІВ	124	<i>N.S. Khopta, H.M. Erstenyuk</i> (Ivano-Frankivsk) CONDITION OF MINERAL MATRIX OF BONE TISSUE OF EXPERIMENTAL ANIMALS UNDER CONDITIONS OF COMBINED ACTION OF XENOBIOTICS
<i>М.М. Корда, Т.Я. Ярошенко, Я.В. Панасюк</i> (Тернопіль) ЕФЕКТ ДОНАТОРІВ ОКСИДУ АЗОТУ L-АРГІНІНУ ТА (+)-(Е)-ЕТИЛ-2-[(Е)ГІДРОКСИМІНО]-5-НІТРО-3-ГЕКСЕНАМІДУ НА ГЕПАТОТОКСИЧНІСТЬ АЛІЛОВОГО СПИРТУ	129	<i>M.M. Korda, T.Ya. Yaroshenko, Ya.V. Panasyuk</i> (Ternopil) THE EFFECT OF NO DONORS L-ARGININE AND FK409 ON THE ALLYL ALCOHOL HEPATOTOXICITY
<i>О.І. Харченко, В.О. Чайка, Л.М. Гайда, Л.І. Богун, Л.І. Остапченко</i> (Київ) АКТИВНІСТЬ ГЛУТАТІОНТРАНСФЕРАЗИ В РІЗНИХ ОРГАНАХ ЩУРІВ ЗА УМОВ ХРОНІЧНОЇ АЛКОГОЛЬНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ ПРИ ВПЛИВІ ОЦТОВОКИСЛОГО ЦИНКУ	132	<i>O.I. Kharchenko, V.O. Chayka, L.M. Gayda, L.I. Bogun, L.I. Ostapchenko</i> (Kyiv) GLUTATHIONE TRANSFERASE ACTIVITY IN DIFFERENT RAT ORGANS UNDER CHRONIC ALCOHOLIC INTOXICATION AND ACETIC ZINC INFLUENCE
<i>О.М. Хижняк</i> (Дніпропетровськ) ГЛІКОЗИЛЬОВАНІСТЬ ПОВЕРХНЕВИХ ГЛІКОКОН'ЮГАТІВ ІМУНОКОМПЕТЕНТНИХ КЛІТИН ПРИ НОВОУТВОРЕННЯХ ГОЛОВИ ТА ШИЇ	136	<i>O.M. Khyzhnyak</i> (Dnipropetrovsk) GLYCOSYLATION OF SUPERFICIAL GLYCOCONJUGATES OF IMMUNE-COMPETENT CELLS AT ONCOPATHOLOGY OF HEAD AND NECK
<i>Н.І. Вдовіченко, Л.І. Воробйова, Ю.Є. Мікулінський, В.Є. Кульшин</i> (Харків) АНАЛІЗ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНА PSA З МЕТОЮ РАННЬОЇ ДІАГНОСТИКИ РАКУ ПЕРЕДМІХУРОВОЇ ЗАЛОЗИ	140	<i>N.I. Vdovichenko, L.I. Vorobyova, Yu.Ye. Mikulinsky, V.Ye. Kulshyn</i> (Kharkiv) ANALYSIS OF PSA GENE EXPRESSION WITH THE PURPOSE OF EARLY PROSTATE CANCER DIAGNOSTICS
<i>К.О. Дворщенко, С.А. Сенін, І.С. Бездольна, Ю.В. Степанов</i> (Київ) ЖИРНОКИСЛОТНИЙ СКЛАД МІТОХОНДРІЙ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ШЛУНКА ЩУРІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ВИРАЗКИ	143	<i>K.O. Dvorshchenko, S.A. Senin, I.S. Bezdolna, Yu.V. Stepanov</i> (Kyiv) SPECTRUM OF FATTY ACIDS OF STOMACH MUCOSA MITOCHONDRIA OF RATS AT EXPERIMENTAL ULCER
<i>Г.О. Федорова, Б.Г. Борзенко</i> (Донецьк) ЗМІНИ АКТИВНОСТІ МІДЬЗАЛЕЖНИХ АНТИОКСИДАНТНИХ ФЕРМЕНТІВ ТА РОЗВИТОК НІТРОЗАТИВНОГО СТРЕСУ В ОБПЕЧЕНИХ	146	<i>H.O. Fedorova, B.H. Borzenko</i> (Donetsk) ALTERATIONS OF COPPER-DEPENDENT ANTIOXIDANTIVE ENZYMES ACTIVITY AND NITROSATIVE STRESS DEVELOPMENT IN BURN PATIENTS
<i>Ю.В. Нікітченко, В.М. Дзюба, А.С. Попович, В.В. Бондар, Г.О. Шеремет</i> (Харків) СТАН ФЕРМЕНТАТИВНОЇ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ В ТКАНИНАХ ЩУРІВ ЗА УМОВ НАДМІРНОГО ХАРЧУВАННЯ	149	<i>Yu.V. Nikitchenko, V.M. Dzyuba, A.S. Popovych, V.V. Bondar, H.O. Sheremet</i> (Kharkiv) STATE OF ENZYMATIC ANTIOXIDANT SYSTEM IN RATS TISSUES UNDER OVERNUTRITION
<i>Л.Л. Гнатишина, Г.І. Фальфушинська, О.Б. Столяр</i> (Тернопіль) СПЕЦИФІЧНІ БІОХІМІЧНІ МАРКЕРИ МОЛЮСКІВ У ОЦІНЦІ БІОЛОГІЧНОЇ БЕЗПЕКИ	152	<i>L.L. Hnatyshyna, H.I. Falfushynska, O.B. Stoliar</i> (Ternopil) SPECIFIC BIOCHEMICAL MARKERS OF MOLLUSCS IN THE ASSESSMENT OF BIOLOGICAL SAFETY
<i>А.Л. Загайко, Бакір Махер Назен, Н.В. Шишкіна, О.В. Файзуллін</i> (Харків) ВИВЧЕННЯ РАНОЗАГОЮВАЛЬНОЇ ДІЇ ОЛІЇ КІСТОЧОК ВИНОГРАДУ НА МОДЕЛІ ТРАФАРЕТНИХ РАН	155	<i>A.L. Zahayko, Bakir Maher Nazen, N.V. Shyshkina, O.V. Faisullin</i> (Kharkiv) STUDY OF WOUND HEALING ACTION OF OIL FROM GRAPE SEEDS ON THE MODEL OF TRAPHARET WOUNDS
<i>Г.В. Петрова, Г.В. Донченко, О.В. Паршиков</i> (Київ) ВПЛИВ КВЕРЦЕТИНУ ТА α -ТОКОФЕРОЛУ НА ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ ТИМОЦИТІВ ЩУРА ЗА УМОВ ІНГІБУВАННЯ ДИХАЛЬНОГО ЛАНЦЮГА МІТОХОНДРІЙ	158	<i>H.V. Petrova, H.V. Donchenko, O.V. Parshykov</i> (Kyiv) INFLUENCE OF QUERCETIN AND α -TOCOPHEROL ON RAT THYMOCYTES SURVIVAL AT INHIBITION OF MITOCHONDRIAL RESPIRATORY CHAIN

ТЕЗИ КОНФЕРЕНЦІЇ

<i>О.О. Кокошкіна, О.В. Запороженко</i> (Одеса) ВПЛИВ ВВЕДЕННЯ НІКОТИНОВОЇ КИСЛОТИ НА ПІРУВАТДЕГІДРОГЕНАЗНУ АКТИВНІСТЬ У ТКАНИНАХ ЩУРІВ ПІСЛЯ РЕНТГЕНІВСЬКОГО ОПРОМІНЕННЯ	161
<i>Р.В. Гуменюк, В.С. Гойдик, А.І. Гоженко</i> (Одеса) ОСОБЛИВОСТІ ПЕРЕБІГУ ХРОНІЧНОГО ПІЄЛОНЕФРИТУ НА ФОНІ ВІЛ-ІНФЕКЦІЇ	161
<i>М.В. Чорна, Я.І. Гонський, І.Р. Бекус, Н.А. Васишин</i> (Тернопіль) ВПЛИВ ТИРОЗИНАТУ ЦИНКУ ТА ЕНТЕРОСОРБЕНТУ "ФІБРАБЕТ" НА СТАН АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ У ЩУРІВ, УРАЖЕНИХ СОЛЯМИ КАДМІЮ ТА КОБАЛЬТУ	162
<i>І.В. Мацьопа</i> (Чернівці) КОРЕКЦІЯ МЕЛАТОНІНОМ СУБЦИРКАДАННИХ РИТМІВ ПОКАЗНИКІВ АКТИВНОСТІ ГЛУТАТІОНПЕРОКСИДАЗИ У НИРКАХ ЩУРІВ ПРИ ІНТОКСИКАЦІЇ ТЕТРАХЛОРМЕТАНОМ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО РІВНОДЕННЯ	162
<i>К.А. Посохова, О.О. Шевчук</i> (Тернопіль) ЗМІНИ У СИСТЕМІ ПРООКСИДАНТИ-АНТИОКСИДАНТИ ПІД ВПЛИВОМ АНТИРЕТРОВІРУСНИХ ЗАСОБІВ	163
<i>Н.Є. Лісничук, І.Я. Демків, М.І. Куліцька, Л.П. Масловська</i> (Тернопіль) БІОХІМІЧНІ ЗМІНИ В ОРГАНІЗМІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ТВАРИН ПРИ ТОКСИЧНОМУ ГЕПАТИТІ ЗА КОРЕКЦІЇ СОРБЕНТОМ ГСГД ТА МАГНІТОЛАЗЕРНИМ ВИПРОМІНЮВАННЯМ	164
<i>Н.О. Пентюк, Н.В. Заїчко, А.В. Мельник, І.І. Андрушко, О.І. Штатко</i> (Вінниця) НОВІ АСПЕКТИ ФІЗІОЛОГІЧНОЇ ДІЇ ПРОДУКТІВ ТРАНССУЛЬФУВАННЯ СІРКОВІСНИХ АМІНОКИСЛОТ	164

УТВОРЕННЯ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ В ОРГАНАХ ЩУРІВ

Н.В. Заїчко, Н.О. Пентюк, А.В. Мельник, О.І. Штатко, І.І. Андрушко
ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ М.І. ПИРОГОВА

Досліджено утворення гідроген сульфїду (H_2S) в органах та тканинах щурів. Встановлено, що в печінці, нирках та мозку тварин головними джерелами для синтезу H_2S є цистеїн, тіосульфат-аніон та реакція конденсації гомоцистеїну з цистеїном, тоді як в аорті, мезентеріальних судинах, підшлунковій залозі та слизовій оболонці тонкої кишки – переважно цистеїн. Утворення H_2S з цистеїну відбувається в усіх досліджених тканинах і каталізується цистатіонін- γ -ліазою. В печінці, нирках і мозку синтез H_2S здійснюється з участю цистатіонін- β -синтази та цистеїнамінотрансферази з цистеїну і косубстратів гомоцистеїну та α -кетоглутарату відповідно, а також з участю тіосульфатсульфуртрансферази з тіосульфат-аніона. Найбільш інтенсивно H_2S утворюється в печінці, нирках та мозку.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: гідроген сульфід, ферменти, печінка, мозок, нирки, аорта.

ВСТУП. Гідроген сульфід (H_2S) – біологічно активна молекула, яка є продуктом обміну сірковмісних амінокислот [11]. Інтерес до біологічної ролі H_2S значно посилюється у зв'язку з появою даних про його причетність до регуляції судинного тону, нейромодуляції, процесів запалення та апоптозу, агрегації тромбоцитів [2, 11]. Можливо, механізми формування патологічних станів, асоційованих з гіпергомоцистеїнемією та гіперцистеїнемією, реалізуються через порушення біосинтезу H_2S . Нами було продемонстровано, що у щурів з тіолактоновою гіпергомоцистеїнемією зниження вмісту H_2S в крові корелювало з підвищенням вмісту гомоцистеїну та посиленням агрегації тромбоцитів [1]. Тому вивчення процесів утворення H_2S в різних органах є необхідним для встановлення його фізіологічної ролі в організмі та для розуміння механізмів формування судинних уражень, тромбофілій та інших патологічних станів.

Основними шляхами утворення H_2S є реакції десульфуровання цистеїну, гомоцистеїну та реакція відновлення тіосульфат-аніона. Ці реакції забезпечуються піридоксальфосфат-залежними ферментами – цистатіонін- γ -ліазою (КФ 4.4.1.1), цистатіонін- β -синтазою (КФ 4.2.1.22), цистеїнамінотрансферазою (КФ 2.6.1.3), а також тіосульфатсульфуртрансфера-

зою (КФ 2.8.1.5) [12]. В таблиці 1 наведено відомі з літератури ферментативні реакції, які призводять до утворення H_2S [10-13].

Доведено, що синтез H_2S з високою швидкістю відбувається в печінці, нирках та мозку, а інформація про його утворення в інших тканинах відсутня. Нез'ясованим залишається питання щодо внеску різних ферментних систем в утворення H_2S в окремих органах та ролі різних субстратів у цьому процесі.

Тому метою роботи було вивчити активність ферментів, що забезпечують утворення H_2S в печінці, нирках, мозку, підшлунковій залозі, аорті, мезентеріальних судинах, слизовій оболонці тонкої кишки.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Для досліджень використано 30 білих безпородних щурів масою 250-270 г, які перебували на стандартному раціоні віварію з водним режимом *ad libitum* та 12-годинним світловим режимом день/ніч. Тварин виводили з досліду шляхом декапітації під легким ефірним наркозом.

Печінку, мозок, нирки, підшлункову залозу перфузували холодним 1,15 % розчином калію хлориду, гомогенізували при 3000 об./хв (тефлон-скло) в середовищі 1,15 % калію хлориду в співвідношенні 1:4. Кишечник промивали холодним 1,15 % розчином калію хлориду, після чого відділяли слизову оболонку і гомогенізували її в середовищі 1,15 % калію хлориду в співвідношенні 1:4. Аорту та мезен-

теріальні судини ретельно промивали холодним 1,15 % розчином калію хлориду, видаляли адвенцію, а ендотеліальний та м'язовий шари гомогенізували в середовищі 1,15 % калію хлориду в співвідношенні 1:4. Гомогенати органів центрифугували при 600 g та 4 °C упродовж 30 хв для отримання пост'ядерної фракції.

Активність тіосульфатсульфуртрансферази (ТСТ), цистатіонін-β-синтази (ЦБС), цистатіонін-γ-ліази (ЦГЛ), цистеїнамінотрансферази (ЦАТ) оцінювали з використанням інкубаційних середовищ, склад яких наведено в таблиці 2. Концентрації субстратів та кофакторів, значення рН та тривалість інкубації, які забезпечували оптимальні умови для визначення активності ферментів, було підібрано завчасно.

Утворення H_2S оцінювали за приростом сульфід-аніона, вміст якого визначали за реакцією з N,N-диметил-пара-фенілендіаміном [14]. Концентрацію пірувату визначали за реакцією з 2,4-динітрофенілгідразином [3]. Вміст серину та цистатіоніну визначали методом тонкошарової хроматографії на целюлозі [6]. Вміст цистеїну визначали з нінгідринним реактивом у кислому середовищі [5].

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою стандартних статистичних програм "MS Excel XP". Вірогідність відмінностей оцінювали за t-критерієм Стьюдента.

В роботі використано L-цистеїн, L-цистин, D,L-гомоцистеїн, L-цистатіонін, L-метіонін фірми "Sigma" (США), α-кетоглутарат, дитіотреїтол, піридоксальфосфат, L-серин фірми "Fluka" (Німеччина). Тіосульфат натрію, сульфід натрію, N,N-диметил-пара-фенілендіамін та інші реактиви були вітчизняного виробництва.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Спочатку ми дослідили швидкість утворення H_2S в пост'ядерних гомогенатах печінки, нирок, мозку, аорти, мезентеріальних судин, підшлункової залози та слизової оболонки тонкої кишки щурів при використанні як субстрату одного цистеїну (середовище № 1). За даними літератури [11, 12], цистеїн може метаболізуватись у H_2S з участю двох ферментів – ЦГЛ та ЦБС. Причому перший фермент каталізує перетворення цистеїну в піруват, аміак та H_2S (табл. 1, реакція 1), а другий фермент, відповідно, в серин та H_2S (реакція 3). Для порівняння внеску цих двох реакцій в сумарний синтез H_2S з цистеїну в органах тварин ми зіставили кількість утвореного H_2S з кількістю утвореного пірувату або серину.

Так, в печінці загальна швидкість утворення H_2S з цистеїну складала $(3,09 \pm 0,15)$ нмоль/хв на 1 мг білка. Якби ця реакція каталізувалась

лише ЦБС, то кількості H_2S повинна була б відповідати стехіометрична кількість серину. Однак встановлено, що синтез серину з цистеїну відбувався незначною мірою (дана реакція в печінці становила тільки $(0,094 \pm 0,004)$ нмоль/хв на 1 мг білка). В нирках, мозку та інших органах серин утворювався в кількості, нижчій межі аналітичного визначення. Разом із тим, піруват утворювався з цистеїну з великою швидкістю – $(5,93 \pm 0,25)$ нмоль/хв на 1 мг білка. Тобто реакція десульфування цистеїну з утворенням пірувату є основною. Однак швидкість утворення пірувату практично вдвічі перевищувала швидкість утворення H_2S ($p < 0,05$), хоча ці продукти повинні були б з'являтися в еквімолярній кількості. Подібні співвідношення спостерігались в нирках та мозку. Це протиріччя можна пояснити тим, що частина H_2S , в міру його високої хімічної активності, перетворюється в продукти, які не визначаються за реакцією з N,N-диметил-пара-фенілендіаміном. Відомо, що H_2S легко окиснюється до сульфїту чи тіосульфату, хімічно зв'язується з тіолами, оксидом азоту та іншими сполуками [7, 8, 11, 14]. Ми дослідили, яка кількість доданого до гомогенатів органів H_2S (у вигляді розчинів Na_2Sx9H_2O) відкривається в заданих умовах (інкубація 30 хв, середовище № 1 без цистеїну). З'ясувалось, що втрати H_2S в процесі інкубації складають приблизно 50 %. Отож, якщо врахувати таку поправку, то утворення з цистеїну H_2S практично повністю відповідає утворенню пірувату. Ці дані не залишають підстав для сумнівів, що основний внесок в синтез H_2S з цистеїну належить саме ЦГЛ, яка каталізує десульфування цистеїну з утворенням пірувату, а внесок ЦБС в синтез H_2S (при використанні як субстрату одного лише цистеїну) є незначним, що підтверджують і інші дослідники [4]. Відомо, що ЦГЛ здатна також каталізувати перетворення цистину (дисульфїду цистеїну) в тіоцистеїн, а з нього після конденсації двох його молекул може утворюватись H_2S (табл. 1, реакція 2). Дослідження цього шляху з використанням середовища № 1а показало, що швидкість утворення H_2S з цистину є вкрай низькою в печінці та нирках, а в інших органах не визначається взагалі. Тому більш детально ми даний шлях утворення H_2S не вивчали.

Джерелом H_2S може бути також і реакція конденсації гомоцистеїну з цистеїном, яка відбувається з участю ЦБС (табл. 1, реакція 4). Слід сказати, що гомоцистеїн сам по собі за відсутності цистеїну не є джерелом H_2S . Для оцінки утворення H_2S в реакції конденсації використали середовище № 2, яке містило

Таблиця 1 – Схеми ферментативних реакцій утворення H₂S в тканинах [4, 11-13]

Фермент	Субстрат	Схема реакції
Цистатіонін-γ-ліаза (КФ 4.4.1.1)	Цистеїн	Реакція 1 Цистеїн + H ₂ O → Піруват + H ₂ S + NH ₃
	Цистин	Реакція 2 2Цис-S-S-Цис → 2Цис-S-S-H → Цис-S-S-S-Цис + H ₂ S
Цистатіонін-β-синтаза (КФ 4.2.1.22)	Цистеїн	Реакція 3 Цистеїн + H ₂ O → Серин + H ₂ S
	Гомоцистеїн, цистеїн	Реакція 4 Гомоцистеїн + Цистеїн → Цистатіонін + H ₂ S
Цистеїнамінотранс- фераза (КФ 2.6.1.3)	Цистеїн, α-кетоглутарат	Реакція 5 Цистеїн + α-кетоглутарат → 3-меркаптопіруват + глутамат 3-меркаптопіруват → піруват + H ₂ S
Тіосульфатсульфур- трансфераза (КФ 2.8.1.5)	Тіосульфат	Реакція 6 S ₂ O ₃ ²⁻ + R(SH) ₂ → SO ₃ ²⁻ + H ₂ S + RS ₂

два субстрати – цистеїн та гомоцистеїн. За цих умов продукція H₂S одночасно забезпечується як реакцією десульфурування цистеїну з участю ЦГЛ, так і реакцією конденсації цистеїну з гомоцистеїном з участю ЦБС, тому фактично ми отримуємо сумарну швидкість утворення H₂S з участю обох ферментів. У печінці вона складає (5,84±0,23) нмоль/хв на 1 мг

білка. Ця кількість утвореного H₂S (з урахуванням того, що реально його визначається лише 50 %) практично відповідає сумарній кількості утвореного пірувату (реакція, що каталізується ЦГЛ) та цистатіоніну (реакція, що каталізується ЦБС). Зокрема, піруват утворювався в кількості (5,97±0,24) нмоль/хв на 1 мг білка, а цистатіонін – (5,22±0,23) нмоль/хв на 1 мг білка.

Таблиця 2 – Склад інкубаційних середовищ для визначення активності ферментів, які каталізують утворення H₂S в організмі

№	Фермент	Склад інкубаційних середовищ (кінцеві концентрації)	Продукти, реакції, за якими визначали активність ферментів
1	ЦГЛ та ЦБС	Піридоксальфосфат 0,67 мМ, L-цистеїн 3,3 мМ, трис-буфер 0,083 М (рН 8,5)	Піруват, H ₂ S, серин
1а	ЦГЛ	Піридоксальфосфат 0,67 мМ, L-цистин 3,3 мМ, трис-буфер 0,083 М (рН 8,5)	H ₂ S
2	ЦГЛ та ЦБС	Піридоксальфосфат 0,67 мМ, L-цистеїн 3,3 мМ, трис-буфер 0,083 М (рН 8,5), D,L-гомоцистеїн 3,3 мМ	Піруват, H ₂ S, цистатіонін, серин
3	ЦГЛ та ЦАТ	Піридоксальфосфат 0,67 мМ, L-цистеїн 3,3 мМ, трис-буфер 0,083 М (рН 8,5), α-кетоглутарат 0,825 мМ	H ₂ S, піруват
4	ТСТ	Тіосульфат натрію 0,2 мМ, дитіотреїтол 2,3 мМ, трис-буфер 0,09 М (рН 8,5)	H ₂ S

Примітки:

1. До 1 мл інкубаційного середовища додавали 0,1 мл пост'ядерного гомогенату органів.
2. Температура інкубації – 37 °С.
3. Пробірки герметизували плівкою Parafilm для попередження втрат H₂S.
4. Час інкубації при визначенні активностей № 1, 1а, 2, 3 в печінці та нирках становив 30 хв, в аорті та підшлунковій залозі – 60 хв, у мозку – 120 хв; при визначенні активності № 4 в усіх органах – 10 хв.

Індивідуальний внесок ЦБС ми вираховували як різницю між сумарною продукцією H₂S з цистеїну та гомоцистеїну і десульфуразною активністю ЦГЛ. Сумарна продукція H₂S під дією ЦГЛ та ЦБС в печінці становила (5,84±0,23) нмоль/хв на 1 мг білка, в нирках – (3,82±0,18) нмоль/хв на 1 мг білка, в мозку – (0,63±0,035) нмоль/хв на 1 мг білка. В аорті та інших орга-

нах нами не виявлено приросту H₂S за умови присутності гомоцистеїну в інкубаційному середовищі (середовище № 2).

Утворення H₂S з цистеїну може також відбуватись за рахунок реакції його трансамінування з α-кетоглутаратом під дією ЦАТ (табл. 1, реакція 5). При цьому утворюється 3-меркаптопіруват, який далі спонтанно розкладається

ся до H_2S та пірувату. Для оцінки цього шляху ми використовували середовище № 3, яке містило цистеїн та α -кетоглутарат, що дозволяло визначити сумарне утворення H_2S за рахунок реакції трансамінування цистеїну під дією ЦАТ та реакції десульфурування цистеїну під дією ЦГЛ. Тому активність ЦАТ ми вираховували як різницю між сумарною продукцією H_2S в зазначених умовах та десульфуразною активністю ЦГЛ. Зауважимо, що в цьому випадку кількість утвореного H_2S та пірувату також була еквімолярною. Наприклад, в печінці сумарна швидкість утворення H_2S за присутності в інкубаційному середовищі цистеїну та α -кетоглутарату становила $(5,57 \pm 0,15)$ нмоль/хв на 1 мг білка, тоді як внесок ЦАТ складав $(2,47 \pm 0,10)$ нмоль/хв на 1 мг білка. Сумарна продукція H_2S під дією ЦГЛ та ЦАТ в нирках становила $(4,14 \pm 0,25)$ нмоль/хв на 1 білка, в мозку – $(0,30 \pm 0,029)$ нмоль/хв на 1 білка. В аорті та інших органах нами не виявлено вагомому приросту синтезу H_2S за присутності в інкубаційному середовищі α -кетоглутарату (середовище № 3).

Ми пересвідчилися, що при заміні в середовищі № 3 цистеїну на гомоцистеїн утворення H_2S не відбувається. Тобто гомоцистеїн в реакцію переамінування з утворенням H_2S не вступає.

Дослідження активності ТСТ проводили, використовуючи як субстрати тіосульфат натрію та штучний відновник – дитіотреїтол. В умовах організму роль такого відновника, очевидно, відіграє відновлений глутатіон, який у значній кількості міститься в печінці та нирках, чи, можливо, інші відновники (табл. 1, реакція 6). Утворення H_2S в реакції, каталізованій ТСТ, виявилось досить значним (наприклад, в

печінці воно становило $(13,0 \pm 0,55)$ нмоль/хв на 1 мг білка) і переважало таке в реакціях, каталізованих ЦГЛ, ЦБС або ЦАТ.

В таблиці 3 наведено дані щодо органного розподілу активності ферментів, які каталізують утворення H_2S у щурів. Встановлено, що найвища здатність до утворення H_2S притаманна печінці та ниркам, дещо менша – мозку, аорті та іншим органам. Універсальним шляхом, що забезпечував утворення H_2S в усіх органах, виявилось перетворення цистеїну в піруват та H_2S з участю ЦГЛ (табл. 1, реакція 1). Розташувати органи за зниженням активності ЦГЛ можна в такій послідовності: печінка > нирки > мозок > підшлункова залоза > тонка кишка > аорта, мезентеріальні судини.

Разом із тим, здатність до утворення H_2S в реакції конденсації цистеїну з гомоцистеїном з участю ЦБС (табл. 1, реакція 3) спостерігалась не в усіх органах. Найбільша активність цього шляху визначалась в печінці та нирках, дещо менша – в мозку. В підшлунковій залозі H_2S утворювався за рахунок конденсації гомоцистеїну з цистеїном лише в слідовій кількості, а в інших органах його не виявляли взагалі. Оскільки концентрація гомоцистеїну в тканинах є значно нижчою, ніж цистеїну, то, очевидно, цей шлях утворення H_2S у звичайних умовах не є вагомим, але його значення може зростати за патологічних станів, зокрема при гіпергомоцистеїнемії та гіперцистеїнемії. Це припущення узгоджується з тим фактом, що *in vitro* за високих концентрацій цистеїну, гомоцистеїну та серину до 44 % цистатіоніну утворюється при конденсації гомоцистеїну з цистеїном (з вивільненням H_2S), а за низьких концентрацій даних амінокислот лише 23 % цистатіоніну утворюється при кон-

Таблиця 3 – Розподіл активностей ферментів, які каталізують утворення H_2S в органах щурів

Орган, тканина	Активність ферментів, нмоль/хв на 1 мг білка			
	ЦГЛ	ЦБС	ЦАТ	ТСТ
Печінка	$3,09 \pm 0,15$	$2,75 \pm 0,18$	$2,47 \pm 0,10$	$13,0 \pm 0,55\#$
Нирки	$1,65 \pm 0,11^*$	$2,17 \pm 0,14$	$2,49 \pm 0,18\#$	$3,29 \pm 0,14^*\#$
Мозок	$0,271 \pm 0,030^*$	$0,357 \pm 0,027^*$	$0,027 \pm 0,003^*$	$1,25 \pm 0,08^*\#$
Аорта	$0,126 \pm 0,012^*$	0	0	сліди
Мезентеріальні судини	$0,120 \pm 0,013^*$	0	0	сліди
Підшлункова залоза	$0,215 \pm 0,019^*$	сліди	0	0
Слизова оболонка тонкої кишки	$0,177 \pm 0,014^*$	0	0	0

Примітки:

- * – $p < 0,05$ відносно активності ферментів у печінці.
- # – $p < 0,05$ відносно активності ЦГЛ у відповідних органах.

денсації гомоцистеїну з цистеїном, тоді як в реальних умовах *in vivo* – приблизно 5 % [4]. Розташувати органи за зменшенням активності ЦБС можна в такій послідовності: печінка > нирки > мозок > підшлункова залоза.

Суттєвий внесок в утворення H_2S забезпечує шлях трансамінування цистеїну з α -кетоглутаратом з участю ЦАТ (табл. 1, реакція 5). Ця реакція найбільш активно відбувається в печінці та нирках, меншою мірою – в мозку, тобто в органах з високою активністю процесів трансамінування. Нами не виявлено здатності до утворення H_2S за рахунок трансамінування цистеїну з α -кетоглутаратом в аорті, підшлунковій залозі та інших органах. Розташувати органи за зменшенням активності ЦАТ можна в такій послідовності: печінка = нирки > мозок.

Альтернативним субстратом для синтезу H_2S в органах виявився тіосульфат-аніон (табл. 1, реакція 6), причому активність ТСТ була значно вищою, ніж активність піридоксальфосфатзалежних ферментів ЦГЛ, ЦБС, ЦАТ. Найбільша здатність до утворення H_2S цим шляхом спостерігалась в печінці та нирках, значно менша – в мозку, аорті, мезентеріальних судинах, була відсутня в інших органах. На сьогодні немає чітких даних щодо вмісту тіосульфат-аніона в органах та тканинах, тому внесок цього ферменту в продукування H_2S в цілісному організмі оцінити важко. З огляду на концентрацію тіосульфату в крові та сечі людей ((1,13±0,11) та (0,28±0,02) мг/дл відповідно) [9], зазначений шлях біосинтезу H_2S все ж таки є можливим. За зменшенням активності ТСТ органи можна розташувати в такій послідовності: печінка > нирки > мозок > аорта, мезентеріальні судини.

При розгляді внеску кожного з ферментів у синтез H_2S в окремих органах було виявлено певні відмінності. Так, в печінці спостерігалась найбільша активність ТСТ – у 4,5-5 разів вища, ніж ЦГЛ, ЦБС та ЦАТ, активності яких були практично зіставними (1,2:1,1:1). В нирках, як і в печінці, активність ТСТ була вищою (в 1,4-2 рази), ніж ЦГЛ, ЦБС, ЦАТ, проте співвідношення активностей цих ферментів становило 0,7:0,9:1. Отже, на відміну від печінки, в нирках друге місце (після ТСТ) за здатністю до утворення H_2S належить ЦАТ. В мозку активність ТСТ також була вищою, ніж ЦГЛ, ЦБС (в 3-4 рази) й, особливо, ЦАТ (в 50 разів). Серед піридоксальфосфатзалежних ферментів у мозку найбільшу активність мала ЦБС, а найнижчу – ЦАТ. Таким чином, співвідношення між активностями ЦГЛ, ЦБС та ЦАТ в мозку становило

1,2:1,6:0,1. Як вже зазначалось вище, в аорті, мезентеріальних судинах, підшлунковій залозі та слизовій оболонці кишечника утворення H_2S відбувалось в основному з цистеїну і забезпечувалось ЦГЛ.

Оскільки ефективними субстратами для синтезу H_2S виявились цистеїн та тіосульфат-аніон, певну зацікавленість викликало порівняння їх внеску в утворення H_2S в різних органах. Ми порівнювали здатність печінки, нирок та мозку до утворення H_2S з цистеїну (з участю ЦГЛ, ЦБС, ЦАТ) та тіосульфат-аніона (рис. 1). Було встановлено, що в печінці та мозку шурів швидкість утворення H_2S з цистеїну поступалась швидкості утворення H_2S з тіосульфат-аніона, тоді як в нирках їх співвідношення було протилежним.

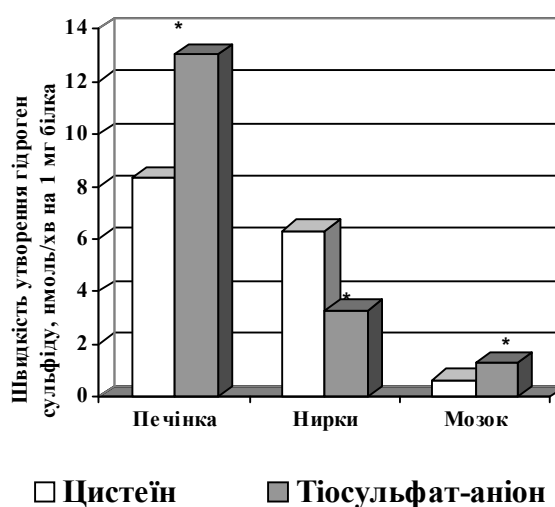


Рис. 1. Швидкість утворення H_2S з цистеїну (з участю ЦГЛ, ЦБС, ЦАТ) та тіосульфат-аніона (з участю ТСТ) в печінці, нирках і мозку шурів.
Примітка. * – $p < 0,05$ порівняно з цистеїном.

Таким чином, нами встановлено, що, крім печінки, нирок, мозку, аорти, здатність до утворення H_2S мають також підшлункова залоза, мезентеріальні судини та слизова оболонка тонкої кишки. За спектром та активністю ферментів, що каталізують синтез H_2S , досліджені органи істотно відрізняються між собою, але для всіх тканин універсальним шляхом синтезу H_2S є десульфурування цистеїну з участю ЦГЛ. Дослідження шляхів синтезу H_2S , з урахуванням його органних особливостей, може стати перспективним напрямком вивчення механізмів формування патології цих органів. Цілком ймовірно, що цілеспрямована модуляція активності ферментів, які каталізують утворення H_2S , може бути одним із шляхів фармакотерапії.

ВИСНОВКИ. 1. Головним субстратом для утворення H_2S в органах щурів є цистеїн. Гомоцистеїн може слугувати джерелом H_2S лише за присутності цистеїну. Цистин не є ефективним субстратом для утворення H_2S .

2. Основним шляхом утворення H_2S в більшості досліджених тканин є десульфування цистеїну з участю ЦГЛ, а утворення H_2S з участю ЦВС та ЦАТ у значній кількості відбувається лише в печінці, нирках та мозку. Найвища активність ферментів, які каталізують утворення H_2S , притаманна печінці та ниркам, значно менша – мозку, аорті й іншим органам.

За здатністю до утворення H_2S досліджені органи можна розташувати в такому порядку: печінка > нирки > мозок > підшлункова залоза > тонка кишка > аорта, мезентеріальні судини.

3. Альтернативним цистеїну та гомоцистеїну джерелом H_2S є реакція відновлення тіо-сульфат-аніона з участю ТСТ. Висока активність даного ферменту спостерігається в печінці та нирках, дещо менша – в мозку, найнижча – в аорті та інших органах. При цьому активність ТСТ в печінці та мозку є більшою, ніж сумарна активність ЦГЛ, ЦВС, ЦАТ, тоді як в нирках їх співвідношення є протилежним.

ЛІТЕРАТУРА

1. Заїчко Н.В. Асоціація середнього об'єму тромбоцитів з рівнем гомоцистеїну та гідроген сульфїду в крові щурів з гіпергомоцистеїнемією // Мед. хімія. – 2008. – **10**, № 2. – С. 54-58.
2. Заїчко Н.В., Пентюк О.О. Вплив аніонів гідросульфїду, дитіонїту, сульфїту, тіосульфату та сульфату на агрегацію тромбоцитів людини // Укр. біохім. журн. – 2009. – **81**, № 1. – С.105-113.
3. Покровский А.А. Биохимические методы исследования в клинике. – М.: Медицина, 1969. – 652 с.
4. Chen X., Jhee K.-H., Kruger W.D. Production of the Neuromodulator H_2S by Cystathionine- β -Synthase via the Condensation of Cysteine and Homocysteine // The Journal of Biological Chemistry. – 2004. – **279**, № 50. – P. 52082-52086.
5. Gaitonde M.K. A spectrophotometric method for direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acid // Biochem. J. – 1967. – **104**, № 2. – P. 627-633.
6. Goldstein J.L., Campbell B.K., Gartler S.M. Cystathionine synthase activity in human lymphocytes: induction by phytohemagglutinin // J. Clin. Invest. – 1972. – **51**, № 4. – P.1034-1037.
7. Hildebrandt T.M., Grieshaber M.K. Three enzymatic activities catalyze the oxidation of sulfide to thiosulfate in mammalian and invertebrate mitochondria // FEBS J. – 2008. – **275**, № 13. – P. 3352-3361.
8. Iciek M., Wlodek L. Biosynthesis and biological properties of compounds containing highly reactive, reduced sulfane sulfur // Pol. J. Pharmacol. – 2001. – **53**, № 3. – P. 215-225.
9. Ivankovich A.D., Braverman B., Stephens T.S. et al. Sodium thiosulfate disposition in humans: relation to sodium nitroprusside toxicity // Anesthesiology. – 1983. – **58**, № 1. – P. 11-17.
10. Koj A., Frendo J., Janik Z. [35S]thiosulphate oxidation by rat liver mitochondria in the presence of glutathione // Biochem. J. – 1967. – **103**, № 3. – P. 791-795.
11. Lowicka E., Beltowski J. Hydrogen sulfide (H_2S) – the third gas of interest for pharmacologists // Pharmacological Reports. – 2007. – **59**. – P. 4-24.
12. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes by the Reactions they Catalyse [Електронний ресурс]. – 2009. – Режим доступу: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>
13. Stipanuk M.H., Beck P.W. Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulfhydration in liver and kidney of the rat // Biochem. J. – 1982. – **206**, № 2. – P. 267-277.
14. Whiteman M., Li L., Kostetski I. et al. Evidence for the formation of a novel nitrosothiol from the gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulfide // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2006. – **343**, № 1. – P. 303-310.

ОБРАЗОВАНИЕ ГИДРОГЕН СУЛЬФИДА В ОРГАНАХ КРЫС

Н.В. Заичко, Н.А. Пентюк, А.В. Мельник, Е.И. Штатко, И.И. Андрушко
ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЦИНСЬКИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ Н.І. ПІРОГОВА

Резюме

Исследовано образование гидроген сульфида (H_2S) в органах и тканях крыс. Установлено, что в печени, почках и мозге животных основными источниками синтеза H_2S являются цистеин, тиосульфат-анион и реакция конденсации гомоцистеина с цистеином, в то время как в аорте, мезентериальных сосудах, поджелудочной железе и слизистой оболочке тонкой кишки – преимущественно цистеин. Образование H_2S из цистеина происходит во всех исследованных тканях и катализируется цистатионин- γ -лиазой. В печени, почках и мозге синтез H_2S осуществляется при участии цистатионин- β -синтазы и цистеинаминотрансферазы из цистеина и косубстратов гомоцистеина и α -кетоглутарата соответственно, а также при участии тиосульфатсульфуртрансферазы из тиосульфат-аниона. Наиболее интенсивно H_2S образовывается в печени, почках и мозге.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гидроген сульфид, ферменты, печень, мозг, почки, аорта.

PRODUCTION OF HYDROGEN SULFIDE IN ORGANS OF RATS

N.V. Zaichko, N.O. Pentjuk, A.V. Melnyk, O.I. Shtatko, I.I. Andrushko
VINNYTSIA NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY BY M.I. PYROHOV

Summary

Formation of hydrogen sulfide (H_2S) in organs and tissues of rats is investigated. It is established that in rat liver, kidney and brain the basic sources of H_2S are cysteine, thiosulphate and condensation of homocysteine with cysteine. Cysteine is main source of H_2S in aorta, mesenteric vessels, pancreas and mucous membrane of small intestine. H_2S formation from cysteine takes place in all investigated tissues and it is catalyzed by cystathionine γ -lyase. In liver, kidney and brain the synthesis of H_2S is catalyzed by cystathionine β -synthase and cysteine aminotransferase from cysteine and co-substrates such as homocysteine and α -ketoglutaric acid. In these organs the synthesis of H_2S is catalyzed by thiosulphate sulfurtransferase from thiosulphate also. H_2S is produced most intensively in liver, kidney and brain.

KEY WORDS: hydrogen sulfide, enzymes, liver, kidney, brain, aorta.

Отримано 24.06.2009 р.

Адреса для листування: Н.В. Заічко, Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова, Хмельницьке шосе, 104, Вінниця, 21029, Україна.

ПОШУК НОВИХ МІСЦЕВОАНЕСТЕЗУВАЛЬНИХ ЗАСОБІВ У РЯДІ ГІДРОХЛОРИДІВ N-R-АМІДІВ 1-ГІДРОКСИ-3-ОКСО-5,6-ДИГІДРО-3H-ПІРОЛО[3,2,1-*lj*]ХІНОЛІН-2-КАРБОНОВОЇ КИСЛОТИ

І.В. Українець, В.В. Кравцова, А.О. Ткач, О.В. Моспанова¹

НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ХАРКІВ
ІНСТИТУТ ХІМІЧНИХ ТЕХНОЛОГІЙ СХІДНОУКРАЇНСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ ІМЕНІ
ВОЛОДИМИРА ДАЛЯ¹, РУБІЖНЕ

*Порівняльний аналіз місцевоанестезувальних властивостей гідрохлоридів N-R-амідів 1-гідрокси-3-оксо-5,6-дигідро-3H-піроло[3,2,1-*lj*]хінолін-2-карбонОВОЇ кислоти та їх хінолонового аналога показав, що на даний вид біологічної активності значно впливає просторова будова досліджуваних сполук.*

КЛЮЧОВІ СЛОВА: амідкування, 4-гідрокси-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбоксаміди, місцеві анестетики, піролохіноліни.

ВСТУП. На сьогодні в умовах амбулаторного прийому застосовують різні методи контролю над болем – загальний наркоз, акупунктуру, гіпноз, електроанестезію, гомеопатію та ін., але жоден з них не є таким же надійним та безпечним, як місцева анестезія [1]. На жаль, ідеального місцевого анестетика поки що не існує і всім сучасним препаратам даної групи тією чи іншою мірою притаманні певні недоліки [3]. З цієї причини над розробкою нових більш досконалих місцевознеболювальних засобів продовжують працювати учені всього світу.

При систематичному вивченні біологічних властивостей 1-R-4-гідрокси-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбоксамідів нами неодноразово відзначались перспективи створення на їх основі нових потенційних лікарських препаратів різного спектра дії, в тому числі й анестетиків [4, 5]. Зокрема, серед найбільш активних сполук увага зверталася на гідрохлорид 2-діетиламіноетиламиду 4-гідрокси-1-етил-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбонОВОЇ кислоти, який за специфічною активністю не поступався відомому місцевому анестетику лідокаїну при нижчій токсичності. Враховуючи дану обставину, цілком логічним та цікавим, з огляду на виявлення закономірностей взаємозв'язку між хімічною будовою та фармакологічною активністю, є дослідження гідрохлоридів N-R-амідів 1-гідрокси-3-оксо-5,6-дигідро-3H-піроло[3,2,1-*lj*]хінолін-2-карбонОВОЇ кислоти. Інте-

рес до вивчення таких сполук викликаний тим, що, з одного боку, вони за будовою дуже близькі до амідів 1, а з іншого – мають суттєву структурну відмінність: їх 1-N-алкільний замісник хоча і містить ті ж самі два атоми вуглецю, але знаходяться вони вже не у відкритому алкільному ланцюгу, а входять до складу пірольного циклу, анельованого з хіноліновим ядром. Така, здавалося б незначна, модифікація призводить до суттєвої просторової перебудови молекули – на відміну від 1-етилзаміщених 4-гідроксихінолонів-2, в яких метильна група етильного замісника ніколи не знаходиться у площині хінолонового циклу [6, 8-11], трициклічна піроло[3,2,1-*lj*]хінолінова система є практично плоскою [7, 12], що повинно обов'язково вплинути і на біологічні властивості. Дати відповідь на запитання, яким саме буде цей вплив, зможе тільки експеримент. Йому і присвячено дане повідомлення.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Синтез гідрохлоридів N-R-амідів 1-гідрокси-3-оксо-5,6-дигідро-3H-піроло[3,2,1-*lj*]хінолін-2-карбонОВОЇ кислоти (2а-м, табл. 1) здійснено шляхом амідкування етилового естеру (3) відповідними діамінами з наступним переведенням проміжних амідів-основ у гідрохлориди та обробкою розчином газоподібного HCl у пропанолі-2.

Висока реакційна здатність 4-гідрокси-3-етоксикарбоніл-2-оксо-1,2-дигідрохінолінів [13], у тому числі їх трициклічного аналога,

© І.В. Українець, В.В. Кравцова, А.О. Ткач, О.В. Моспанова, 2009.

дозволяє ефективно ацилювати ними більшість первинних алкіламінів у досить м'яких умовах при еквімолярному співвідношенні реагентів. Як виняток слід розглядати діаміноалкани з двома первинними аміногрупами. В даному

випадку синтезувати відповідні аміноалкіламіди (2а-г) можна лише при застосуванні великого надлишку аміну, що дозволяє уникати помітного утворення небажаних симетричних N,N'-діацильованих похідних.

Таблиця 1 – Характеристики гідрохлоридів N-R-амідів 1-гідрокси-3-оксо-5,6-дигідро-3H-піроло[3,2,1-ij]хінолін-2-карбонових кислот (2а-м)

Сполука	Емпірична формула	Т. пл., °C	Знайдено, %			Вирахувано, %			Вихід, %
			C	H	N	C	H	N	
2а	C ₁₄ H ₁₅ N ₃ O ₃ · HCl	283-285	54,41	5,30	13,48	54,29	5,21	13,57	68
2б	C ₁₅ H ₁₇ N ₃ O ₃ · HCl	290-292	55,76	5,71	13,07	55,64	5,60	12,98	74
2в	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₃ · HCl	241-243	56,97	6,09	12,35	56,89	5,97	12,44	70
2г	C ₁₈ H ₂₃ N ₃ O ₃ · HCl	164-166	58,96	6,52	11,37	59,09	6,61	11,49	75
2д	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₃ · HCl	287-289	56,80	5,88	12,53	56,89	5,97	12,44	83
2е	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₄ · HCl	223-225	54,41	5,63	11,75	54,32	5,70	11,88	80
2ж	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₃ · HCl	258-260	56,98	6,02	12,51	56,89	5,97	12,44	92
2з	C ₁₈ H ₂₃ N ₃ O ₃ · HCl	242-244	59,16	6,70	11,56	59,09	6,61	11,49	87
2и	C ₁₇ H ₂₁ N ₃ O ₃ · HCl	225-227	57,93	6,22	11,84	58,04	6,30	11,94	79
2і	C ₁₉ H ₂₅ N ₃ O ₃ · HCl	170-172	59,95	6,81	10,93	60,07	6,90	11,06	76
2к	C ₁₈ H ₂₂ N ₄ O ₃ · 2HCl	251-253	52,18	5,75	13,37	52,06	5,82	13,49	83
2л	C ₁₈ H ₂₁ N ₃ O ₄ · HCl	244-246	57,01	5,93	11,14	56,92	5,84	11,06	90
2м	C ₁₉ H ₂₃ N ₃ O ₄ · HCl	229-231	57,86	6,05	10,56	57,94	6,14	10,67	86

Всі одержані гідрохлориди N-R-амідів 1-гідрокси-3-оксо-5,6-дигідро-3H-піроло-[3,2,1-ij]хінолін-2-карбонової кислоти (2а-м) є безбарвними кристалічними речовинами, які при кімнатній температурі легко розчиняються у воді, помірно – у спирті та практично не розчиняються у гексані й безводному діетиловому естері. Для підтвердження їх будови використано спектроскопію ЯМР ¹H (табл. 2), яка дозволяє ідентифікувати всі протонівмісні функціональні групи. Найбільш характерною ознакою одержаних спектрів ЯМР ¹H, загальною для всіх амідів (2а-г), можна назвати типовий для АВС-спінових систем набір сигналів в "ароматичній" ділянці спектра, а також наявність зумовлених протонами метиленових ланок пірольного ядра двох триплетів інтенсивністю 2H кожний у сильному полі. Перекривання сигналів хоча й рідко, але все ж таки трапляються. Як приклад можна навести спектр аміду 2м, в якому на досить короткому відрізку "аліфатичної" ділянки скупчуються одночасно декілька складних мультиплетів, внаслідок чого їх інтерпретація дещо ускладнюється і стає можливою лише за загальною інтегральною інтенсивністю.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА. Спектри ЯМР ¹H синтезованих речовин зареєстровано на спектрометрі Varian Mercury-VX-200,

робоча частота складала 200 МГц, в усіх випадках розчинник DMSO-D₆, внутрішній стандарт – ТМС. Вихідний етиловий естер 1-гідрокси-3-оксо-5,6-дигідро-3H-піроло[3,2,1-ij]хінолін-2-карбонової кислоти (3) одержано описаним нами раніше способом [12].

Гідрохлорид 2-аміноетиламіду 1-гідрокси-3-оксо-5,6-дигідро-3H-піроло[3,2,1-ij]хінолін-2-карбонової кислоти (2а). До розчину 2,59 г (0,01 моль) естеру (3) в 15 мл етилового спирту додають 3,35 мл (0,05 моль) етилендіаміну і кип'ятять протягом 3 год. Зворотний холодильник замінюють спадним, і під зниженим тиском відганяють розчинник та надлишок етилендіаміну. Залишок розчиняють у 10 мл пропанолу-2, додають насичений газоподібним HCl пропанол-2 до рН ~ 4, після чого витримують реакційну суміш 7-8 год при температурі близько 0 °C. Кристали гідрохлориду аміду (2а) відфільтровують, промивають діетиловим естером, сушать.

Гідрохлориди аміноалкіламідів (2б-г) одержано аналогічно.

Гідрохлорид 2-диметиламіноетиламіду 1-гідрокси-3-оксо-5,6-дигідро-3H-піроло-[3,2,1-ij]хінолін-2-карбонової кислоти (2д). До розчину 2,59 г (0,01 моль) естеру (3) в 15 мл етилового спирту додають 1,09 мл (0,01 моль) диметиламіноетиламіну і кип'ятять протягом 3 год. Розчинник видаляють з реакційної суміші

Таблиця 2 – Спектри ЯМР ¹H синтезованих сполук, δ, м.д.

Сполука	Хімічні зсуви, δ, м.д.*					
	Піроло-хінолінове ядро					R · HCl
	H-9 (1H, д)	H-7 (1H, д)	H-8 (1H, т)	CH ₂ -5 (2H, т)	CH ₂ -6 (2H, т)	
2а	7,71	7,56	7,24	4,30	3,41	8,03 (3H, уш. с, N ⁺ H ₃); 3,66 (2H, к, CONHCH ₂); 3,05 (2H, м, NCH ₂ CH ₂ N ⁺ H ₃)
2б	7,68	7,57	7,26	4,31	3,40	7,97 (3H, уш. с, N ⁺ H ₃); 3,50 (2H, к, CONHCH ₂); 2,84 (2H, м, NHCH ₂ CH ₂ CH ₂ N ⁺ H ₃); 1,89 (2H, м, NHCH ₂ CH ₂ CH ₂ N ⁺ H ₃)
2в	7,66	7,57	7,23	4,28	3,38	7,95 (3H, уш. с, N ⁺ H ₃); 3,51 (2H, к, CONHCH ₂); 2,81 (2H, м, NHCH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₂ N ⁺ H ₃); 1,62 (4H, м, NHCH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₂ N ⁺ H ₃)
2г	7,69	7,55	7,21	4,30	3,39	7,90 (3H, уш. с, N ⁺ H ₃); 3,50 (2H, к, CONHCH ₂); 2,79 (2H, м, NHCH ₂ (CH ₂) ₄ CH ₂ N ⁺ H ₃); 1,70-1,37 (8H, м, NHCH ₂ (CH ₂) ₄ CH ₂ N ⁺ H ₃)
2д	7,71	7,58	7,24	4,31	3,42	8,75 (2H, уш. с, N ⁺ H ₂); 3,70 (2H, к, NHCH ₂); 3,00 (4H, м, NH(CH ₂) ₂); 1,21 (3H, т, NCH ₂ CH ₃)
2е	7,70	7,56	7,23	4,30	3,41	8,82 (2H, уш. с, N ⁺ H ₂); 3,70 (5H, м, CONHCH ₂ + CH ₂ OH); 3,01 (4H, м, CH ₂ NHCH ₂)
2ж	7,72	7,57	7,25	4,33	3,40	10,06 (1H, уш. с, N ⁺ H); 3,77 (2H, к, NHCH ₂); 3,31 (2H, т, NCH ₂ CH ₂); 2,82 (6H, с, 2CH ₃)
2з	7,70	7,55	7,24	4,32	3,38	10,67 (1H, уш. с, N ⁺ H); 3,85 (2H, к, NHCH ₂); 3,28-3,11 (6H, м, N(CH ₂) ₃); 1,29 (6H, т, 2CH ₃)
2и	7,68	7,57	7,23	4,31	3,38	10,10 (1H, уш. с, N ⁺ H); 3,49 (2H, к, NHCH ₂); 3,11 (2H, м, CH ₂ N(CH ₃) ₂); 2,73 (6H, с, 2CH ₃); 2,00 (2H, кв, NCH ₂ CH ₂)
2і	7,70	7,56	7,22	4,32	3,39	10,37 (1H, уш. с, N ⁺ H); 3,50 (2H, к, NHCH ₂); 3,12 (6H, м, N(CH ₂) ₃); 1,93 (2H, кв, NCH ₂ CH ₂); 1,24 (6H, т, 2CH ₃)
2к	7,69	7,55	7,23	4,30	3,41	9,61 (3H, уш. с, N ⁺ H + N ⁺ H ₂); 3,74 (2H, к, CO-NHCH ₂); 3,36-3,20 (8H, м, 4CH ₂ піперазину); 3,11 (2H, т, NHCH ₂ CH ₂ N)
2л	7,66	7,54	7,21	4,25	3,42	11,24 (1H, уш. с, N ⁺ H); 3,88 (6H, м, NHCH ₂ + O(CH ₂) ₂); 3,30-3,09 (6H, м, N(CH ₂) ₃)
2м	7,68	7,56	7,22	4,30	Див. R	10,89 (1H, уш. с, N ⁺ H); 3,87 (4H, м, O(CH ₂) ₂); 3,51-3,34 (6H, м, NHCH ₂ CH ₂ CH ₂ N + CH ₂ -6); 3,15-3,06 (4H, м, N(CH ₂) ₂); 2,04 (2H, кв, NHCH ₂ CH ₂)

Примітка. * Протони 1-OH-груп проявляються синглетами інтенсивністю 1H у слабкому полі при 17,20-16,65 м.д. Сигнали протонів амідних груп мають вигляд триплетів інтенсивністю 1H при 10,47-10,38 м.д.

під зниженим тиском. До залишку додають 20 мл води, підкислюють HCl до pH ~ 4, а потім обробляють 0,1 г натрію гідросульфїту й активованим вугільям. Фільтрують, до фільтрату додають розчин NaOH до pH ~ 8. Амід-основу, яка при цьому виділяється у вигляді маслянистого осаду, екстрагують хлористим метиленом (3 x 10 мл). Органічні витяжки поєднують, розчинник відганяють під зниженим тиском, одночасно видаляючи у вигляді азеотропу і залишки води. Подальше переведення амїду-основи у гідрохлорид та виділення кінцевого продукту проводять за методикою, наведеною у попередньому прикладі.

Гідрохлориди моно- та діалкіламіноалкіламідів (2д-м) одержано аналогічно.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Місцевонастезувальну активність 0,5 % водних розчинів гідрохлоридів N-R-амїдів 1-гідрокси-3-оксо-5,6-дигїдро-3H-піроло[3,2,1-ij]-хінолін-2-карбонової кислоти (2а-м) в умовах інфільтраційної анестезії вивчали на самцях морських свинок рудо-чорно-білої масті масою 200-250 г за методом Бюльбринг-Уейда [2]. Аналіз одержаних при цьому експериментальних даних (табл. 3) свідчить про те, що сполуки з первинними аміногрупами, тобто амїди (2а-г), знеболювальних властивостей практично не проявляють. Слабка активність (анестезія триває не більше 5 хв, причому фаза повної втрати чутливості також не настає) з'являється у моноалкіламіноалкіламідів (2д-е).

І лише з введенням другого алкільного залишку в термінальну аміногрупу (аміди 2ж-м) місцевоанестезувальна дія досліджуваних зразків помітно зростає, але й у цьому випадку її тривалість залишається досить короткою – наприклад, для найбільш активної діетил-

аміноетильної похідної (2з) цей показник не перевищує 40 хв, хоча індекс інфільтраційної анестезії [2] і досягає максимально можливої величини. Для порівняння – амід (1) в аналогічних умовах викликає анестезію тривалістю понад 2 год.

Таблиця 3 – Біологічні властивості синтезованих сполук

Сполука	Інфільтраційна анестезія			Подразливий ефект, бали
	Початок анестезії, хв	Індекс	Тривалість повної анестезії, хв	
2а	4,3±0,28	1,1	Не настає	0
2б	3,8±0,21	2,7	Не настає	0
2в	4,6±0,33	2,0	Не настає	0
2г	4,9±0,39	1,2	Не настає	0
2д	3,2±0,30	5,1	Не настає	0
2е	3,6±0,27	3,5	Не настає	0
2ж	2,8±0,31	12,2	10,6±1,20	2
2з	2,0±0,17	36,0	39,8±2,37	1
2и	3,0±0,28	9,8	9,2±1,33	2
2і	2,9±0,32	14,2	15,9±1,24	1
2к	3,8±0,45	6,4	5,3±1,45	1
2л	2,2±0,26	27,0	25,5±1,62	0
2м	3,0±0,34	16,2	14,7±1,18	0
Амід 1	1,8±0,10	36,0	130,9±9,11	2

Цікаво, що подразлива дія 2 % водних розчинів амідів (2а-м), яку визначали на рогівці ока кролика за спрощеним варіантом методу Сетнікара [2], у більшості випадків дещо зменшувалась порівняно з амідом 1, незважаючи на те, що кислотність 4-ОН-груп 1-гідрокси-3-оксо-5,6-дигідро-3Н-піроло[3,2,1-*ij*]хінолін-2-карбонової кислоти та її 1-N-етильного аналога була практично однаковою.

В цілому ж, на підставі проведених фармакологічних випробовувань, можна констатувати – структурна перебудова молекули, яка супроводжує перехід від 1-алкілзаміщених 4-гідроксихінолонів-2 до трициклічних піролохінолонів, досить негативно впливає на

місцевоанестезувальні властивості сполук даного класу і тому може бути визнана безперспективною.

ВИСНОВКИ. 1. Розроблені препаративні методики одержання та здійснено синтез гідрохлоридів N-R-амідів 1-гідрокси-3-оксо-5,6-дигідро-3Н-піроло[3,2,1-*ij*]хінолін-2-карбонової кислоти.

2. Експериментально встановлено, що заміна просторово об'ємних 1-алкіл-4-гідрокси-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбоксамідів плоскими піролохінолоновими аналогами призводить до втрати здатності викликати місцеву анестезію.

ЛІТЕРАТУРА

1. Зорян Е.В., Рабинович С.А., Матвеева Е.Г. Алгоритм выбора местноанестезирующих препаратов: проблемы и решения // Клини. стоматология. – 2008. – № 1. – С. 8-22.
2. Мамчур В.И., Коваленко Е.Ю., Степанюк Г.И., Столярчук А.А. Экспериментальное (доклиническое) изучение новых местноанестезирующих средств: Методические рекомендации. – К.: ГФЦ МЗ Украины, 2003. – 48 с.
3. Машковский М.Д. Лекарственные средства. – 15-е изд., перераб., испр. и доп. – М.: ООО "Издательство Новая Волна", 2005. – С. 307-315.

4. Пат. 24967 Україна, МКВ С07D 215/22, А61К 31/47. Спосіб одержання гідрохлориду діетиламіноетиламіду 1-пропіл-2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонової кислоти / І.В. Українець, П.О. Безуглий, О.В. Горохова та ін. – Опубл. 25.12.98. – Бюл. № 6.
5. Українець І.В. Синтез, химические превращения и биологические свойства алкил(арил)амидов малоновой кислоты: Дис. ... д-ра хим. наук. – Харьков, 1992. – 196 с.
6. Baumer V.N., Shishkin O.V., Ukrainets I.V. et al. 1-Ethyl-4-hydroxyquinolin-2(1H)-one // Acta Cryst. – 2004. – 60. – P. 2356-2358.

7. Ukrainets I.V., Bereznyakova N.L., Mospanova E.V. 4-Hydroxy-2-quinolones. 121. Synthesis and biological properties of 1-hydroxy-3-oxo-5,6-dihydro-3H-pyrrolo[3,2,1-ij]-quinoline-2-carboxylic acid alkylamides // Chem. Heterocycl. Comp. – 2007. – **43**, № 7. – P. 856-862.

8. Ukrainets I.V., Bereznyakova N.L., Shishkina S.V. 4-Hydroxy-2-quinolones. 127. Simple method for exchanging chlorine for hydroxyl in 1-R-4-chloro-3-ethoxycarbonyl-2-oxo-1,2-dihydroquinolines // Chem. Heterocycl. Comp. – 2007. – **43**, № 9. – P. 1154-1158.

9. Ukrainets I.V., Bereznyakova N.L., Sidorenko L.V., Shishkina S.V. 4-Hydroxy-2-quinolones. 114. Synthesis and structure of 6-R-5-hydroxy-2,4-dioxo-2,3,4,6-tetrahydrobenzo-[c][2,7]naphthyridine-1-carbonitriles // Chem. Heterocycl. Comp. – 2007. – **43**, № 5. – P. 608-616.

10. Ukrainets I.V., Gorokhova O.V., Sidorenko L.V., Bereznyakova N.L. 4-Hydroxy-2-quinolones. 111.

Simple synthesis of 1-substituted 4-methyl-2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carboxylic acids // Chem. Heterocycl. Comp. – 2007. – **43**, № 1. – P. 58-62.

11. Ukrainets I.V., Sidorenko L.V., Gorokhova O.V. 4-Hydroxy-2-quinolones. 84. Synthesis of 5-R-5H-5,7a,12-triazabenzof[a]anthracene-6,7-diones // Chem. Heterocycl. Comp. – 2005. – **41**, № 7. – P. 896-904.

12. Ukrainets I.V., Sidorenko L.V., Gorokhova O.V. et al. 4-Hydroxy-2-quinolones. 94. Improved synthesis and structure of ethyl 1-hydroxy-3-oxo-5,6-dihydro-3H-pyrrolo[3,2,1-ij]-quinoline-2-carboxylic acid ethyl ester // Chem. Heterocycl. Comp. – 2006. – **42**, № 5. – P. 631-635.

13. Ukrainets I.V., Sidorenko L.V., Svechnikova E.N., Shishkin O.V. 4-Hydroxy-2-quinolones. 130. The reactivity of ethyl 4-hydroxy-2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carboxylates // Chem. Heterocycl. Comp. – 2007. – **43**, № 10. – P. 1275-1279.

ПОИСК НОВЫХ МЕСТНОАНЕСТЕЗИРУЮЩИХ СРЕДСТВ В РЯДУ ГИДРОХЛОРИДОВ N-R-АМИДОВ 1-ГИДРОКСИ-3-ОКСО-5,6-ДИГИДРО-3H-ПИРРОЛО[3,2,1-*IJ*]ХИНОЛИН-2-КАРБОНОВОЙ КИСЛОТЫ

И.В. Украинец, В.В. Кравцова, А.А. Ткач, Е.В. Моспанова¹
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ ВОСТОЧНОУКРАИНСКОГО НАЦИОНАЛЬНОГО УНИВЕРСИТЕТА
ИМЕНИ ВЛАДИМИРА ДАЛЯ¹, РУБЕЖНОЕ

Резюме

Сравнительный анализ местноанестезирующих свойств гидрохлоридов N-R-амидов 1-гидрокси-3-оксо-5,6-дигидро-3H-пирроло[3,2,1-ij]хинолин-2-карбоновой кислоты и их хинолонового аналога показал, что на данный вид биологической активности значительно влияет пространственное строение исследуемых соединений.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: амидирование, 4-гидрокси-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-3-карбоксамиды, местные анестетики, пирролохинолины.

SEARCH OF NEW LOCAL ANESTHETICS IN THE RANGE OF 1-HYDROXY-3-OXO-5,6-DIHYDRO-3H-PYRROLO[3,2,1-*IJ*]QUINOLINE-2-CARBOXYLIC ACID N-R-AMIDES HYDROCHLORIDES

I.V. Ukrainets, V.V. Kravtsova, A.O. Tkach, O.V. Mospanova¹
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV
CHEMICAL TECHNOLOGIES INSTITUTE OF THE VOLODYMYR DAL
EASTERN-UKRAINIAN NATIONAL UNIVERSITY¹, RUBIZHNE

Summary

A comparative analysis of the topical anesthetic properties of 1-hydroxy-3-oxo-5,6-dihydro-3H-pyrrolo[3,2,1-ij]quinoline-2-carboxylic acid N-R-amides hydrochlorides and their quinolone analogue has shown that the given type of the biological activity influences greatly on the spacious structure of the compounds studied.

KEY WORDS: amidation, 4-hydroxy-2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carboxamides, local anesthetics, pyrrolo-quinolines.

Отримано 26.01.2009 р.

Адреса для листування: І.В. Українець, Національний фармацевтичний університет, вул. Пушкінська, 53, Харків, 61002, Україна.

АНАЛЬГЕТИЧНА АКТИВНІСТЬ ТІОПОХІДНИХ 5-R₁-4-R₂-1,2,4-ТРИАЗОЛ-3-ТІОНІВ**А.Г. Каплаушенко, О.І. Панасенко, Є.Г. Книш,
Т.О. Панасенко, О.О. Свінтозельський
ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

Вивчено анальгетичну активність 3-алкілтію, 3-гетерилтію, 3-ацилалкілтію, 3-карбоксиметилтію 5-R₁-4-R₂-1,2,4-тріазолів та продуктів їх хімічних перетворень. Встановлено закономірності відносно будови досліджуваних сполук і показників їх анальгетичної активності.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: 1,2,4-тріазоли, анальгетична активність.

ВСТУП. Серед актуальних проблем сучасної фармації особливу увагу приділяють створенню нових лікарських засобів. Вітчизняні й іноземні вчені [5-8] постійно проводять цілеспрямований синтез потенційних біологічно активних сполук та досліджують фармакологічну активність отриманих речовин. Нами на основі 1,2,4-тріазолу останнім часом синтезовано ряд нових 3-тіопохідних [5-7], серед яких виявлено сполуки, що є нетоксичними або малотоксичними [3, 4, 7] і мають високі показники фармакологічної активності [6, 7]. З огляду на це, продовження вивчення біологічної активності синтезованих похідних 1,2,4-тріазолу є актуальним, має теоретичну і практичну значимість.

Метою нашого дослідження було вивчити анальгетичну активність синтезованих сполук та встановити закономірності між будовою похідних 1,2,4-тріазол-3-тіону та їх анальгетичною дією.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди проводили на кафедрі клінічної фармакології і фармації Запорізького державного медичного університету.

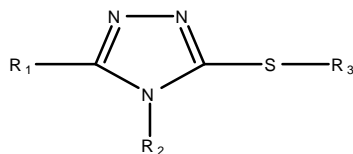
Анальгетичну активність синтезованих сполук визначали на моделі "судом" [7] на окремих групах із 7-ми безпородних щурів обох статей масою 140-170 г. Судоми викликали шляхом внутрішньочеревного введення 0,75 % розчину кислоти ацетатної в дозі 1 мл на 100 г маси тварини (контрольна група). Тваринам 2-ї групи внутрішньочеревно вводили дослідну сполуку в дозі 1/10 від ЛД₅₀ [4] за 30 хв до

введення розчину кислоти ацетатної з дотриманням правил асептики та антисептики відповідно до методичних вказівок ДФЦ МОЗ України з доклінічного вивчення потенційних лікарських засобів [2]. Еталонами порівняння були відомі анальгетичні засоби вольтарен і анальгін, які вводили внутрішньочеревно тваринам 3-ї і 4-ї груп за 30 хв до введення розчину кислоти ацетатної в дозі 8 і 50 мг/кг відповідно. Підрахунок кількості судом проводили через 15 хв після введення розчину кислоти ацетатної протягом 30 хв. Показником анальгезивної активності слугувала кількість судом відносно контролю. Статистичну обробку одержаних результатів проводили за допомогою критерію Стьюдента [1]. Отримані дані наведено в таблицях 1-8.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Проведені досліди показали, що значення анальгетичної активності нових похідних 1,2,4-тріазол-3-тіону (табл. 1-8) перебувають у межах 1,2-63,4 %, при цьому на досліджувану біологічну дію даних речовин значною мірою впливають наявність і характер замісників по ядру 1,2,4-тріазолу, а також природа замісників по атому сірки при С₃-атомі 1,2,4-тріазолового циклу.

Стосовно анальгетичної активності 3-алкілтію-5-R₁-4-R₂-1,2,4-тріазолів (Ia, б, табл. 1) можна констатувати факт їх незначної дії. Слід зазначити, що введення 4-піридинового радикала в п'яте положення 1,2,4-тріазолового кільця (сполука Іб) призводить до посилення анальгетичної дії. Серед 3-гетерилтію-5-R₁-4-R₂-1,2,4-тріазолів (Iв-д, табл. 1) виявлено речовини, що за показниками анальгетичної дії перевищують активність еталонів порівняння.

Таблиця 1 – Анальгетична активність 5-R₁-4-R₂-3-алкілтіо-1,2,4-тріазолів (Ia, б) і 5-R₁-4-R₂-3-гетерилтіо-1,2,4-тріазолів (Iв-д)



№ сполуки	R ₁	R ₂	R ₃	Кількість судом за 30 хв	Довірчий інтервал при p=0,05	Кількість судом у % до контролю	Анальгетичний ефект
Контроль				61,7±3,23	48ч71	100	0
Вольтарен				34,3±1,74	27ч41	55,6	44,4
Анальгін				27,9±1,42	24ч35	45,1	54,9
Ia	H	C ₆ H ₄ OCH ₃ -2	C ₈ H ₁₇	49,6±3,44	34ч61	80,3	19,7
Iб	C ₅ H ₄ N-4	C ₆ H ₄ OCH ₃ -2	C ₈ H ₁₇	37,6±2,58	31ч47	60,9	39,1
Iв	C ₅ H ₄ N-4	C ₆ H ₄ OCH ₃ -2	1-метил-4-нітроімідазоліл-5	23,6±1,46	17ч29	38,2	61,8
Iг	C ₅ H ₄ N-4	C ₆ H ₄ OCH ₃ -2	2-етокси-6-нітроакридиніл-9	32,1±1,91	24ч37	52,1	47,9
Iд	C ₅ H ₄ N-4	C ₆ H ₄ Br-4	1-метил-4-нітроімідазоліл-5	26,3±0,99	24ч31	42,6	57,4

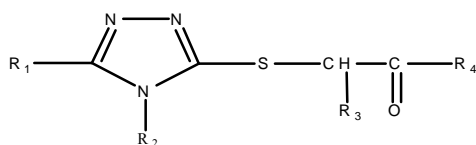
При цьому необхідно відзначити, що 3-(1-метил-4-нітроімідазол-5-іл)тіо-1,2,4-тріазолі (Iв, д) більш активні, ніж 3-(2-етокси-6-нітроакридин-9-іл)-5-(4-піридил)-4-(2-метоксифеніл)-1,2,4-тріазол (Iг).

Перехід до 3-ацилалкілтіо-1,2,4-тріазолів (IIа-в, табл. 2) супроводжується зменшенням анальгетичного ефекту отриманих речовин. Подальше відновлення 2-(4-R₁-5-R₂-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)-1-R₃-2-R₄-етанонів до 2-(4-R₁-5-R₂-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)-1-R₃-2-R₄-етанолів (IIг-д, табл. 2) приводить до подальшого зниження анальгетичної активності. При цьому в разі введення тваринам досліджуваної групи 2-(4-

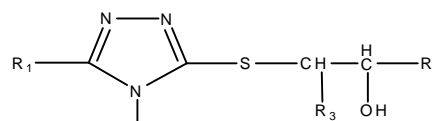
(4-бромфеніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)-1,2-(дифеніл)-етанолу (Iд, табл. 2) спостерігали навіть зростання кількості судом відносно контрольної групи щурів. Це можна пояснити подібною властивостями гідроксильного радикала, що стимулює процес запалення і збільшує кількість судом.

Слабкий анальгетичний ефект 2-(4-(2-метоксифеніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)-ацетатної кислоти (IIIа, табл. 3) можна пояснити наявністю вільної карбоксильної групи. Блокування карбоксильного радикала – перехід до складних естерів 1,2,4-тріазол-3-тіоацетатних кислот супроводжується підвищенням досліджуваної

Таблиця 2 – Анальгетична активність 2-(4-R₁-5-R₂-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)-1-R₃-2-R₄-етанонів (IIа-в) і 2-(4-R₁-5-R₂-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)-1-R₃-2-R₄-етанолів (IIг, д)



IIа-в



IIг, д

N сполуки	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Кількість судом за 30 хв	Довірчий інтервал при p=0,05	Кількість судом у % до контролю	Анальгетичний ефект
IIа	H	CH ₃	C ₆ H ₅	C ₆ H ₅	43,6±2,5	37ч49	70,6	29,4
IIб	H	C ₆ H ₄ Br-4	H	C ₆ H ₄ NO ₂ -4	53,0±5,40	25ч67	85,9	14,1
IIв	C ₅ H ₄ N-4	C ₆ H ₄ OCH ₃ -2	C ₆ H ₅	C ₆ H ₅	43,6±1,94	38ч54	70,6	29,4
IIг	C ₅ H ₄ N-4	C ₆ H ₄ OCH ₃ -2	H	C ₆ H ₅	60,6±2,31	48ч67	98,2	1,8
IIд	H	C ₆ H ₄ Br-4	C ₆ H ₅	C ₆ H ₅	62,4±1,76	55 ч 68	101,2	-1,2

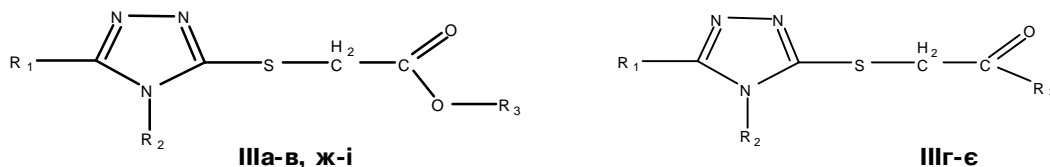
дії отриманих речовин. При цьому, аналогічно 3-октилтіо-1,2,4-тріазолам, наявність в ядрі 1,2,4-тріазолу складного естеру (IIIб) піридинового замісника посилює анальгетичний ефект. Амідні кислоти (IIIг-є) мають досить високі показники анальгетичної дії. При цьому амід IIIг перевищує активність обох еталонів порівняння вольтарену й анальгіну, а 2-(5-(4-піридил)-4-(4-бромфеніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)ацетамід (IIIд) активніший лише за вольтарен.

Щодо анальгетичної активності солей 1,2,4-тріазол-3-ілтіоацетатних кислот (IIIж-і, табл. 3), то вона перебуває на рівні 34-58 %. При цьому солеутворення супроводжується посиленням анальгетичної дії. Слід відзначити, що серед солей найвищу активність має натрієва

сіль (IIIж), а також досить високі показники досліджуваної дії виявлено в амонієвої солі (IIIз).

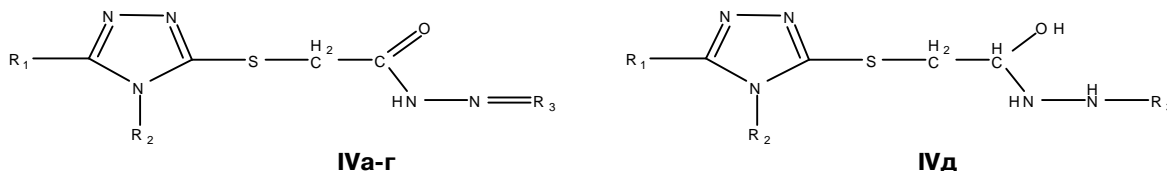
Реакція утворення гідразидів 2-(5-R₁-4-R₂-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)-ацетатних кислот (IVа, б), на відміну від синтезу естерів, амідів і солей, практично не супроводжується зміною досліджуваної активності. Але слід зазначити, що введення метоксигрупи в ортоположення фенільного радикала, що зв'язаний з N-4 ядра тріазолу 2-(1,2,4-тріазол-3-ілтіо)ацетогідразиду (сполуки IVа, б), призводить до підвищення анальгетичного ефекту. Подальша конденсація гідразидів з альдегідами – перехід до відповідних бензиліденгідразидів (IVв, г) не створює умов для отримання речовин з високими показниками анальгетичної дії.

Таблиця 3 – Анальгетична активність 2-(4-R₂-5-R₁-4Н-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)-ацетатної кислоти (IIIа), естерів (IIIб, в), амідів (IIIг-є) і солей (IIIж-і)



N сполуки	R ₁	R ₂	R ₃	Кількість судом за 30 хв	Довірчий інтервал при р=0,05	Кількість судом у % до контролю	Анальгетичний ефект
IIIа	H	C ₆ H ₄ OCH ₃ -2	H	58,0±2,91	47ч68	94,0	6,0
IIIб	H	C ₆ H ₄ OCH ₃ -2	C ₂ H ₅	43,1±0,86	39ч45	69,9	30,1
IIIв	C ₅ H ₄ N-4	C ₆ H ₄ OCH ₃ -2	C ₂ H ₅	33,7±1,91	28ч41	54,6	45,4
IIIг	C ₅ H ₄ N-4	C ₆ H ₄ OCH ₃ -2	NH(CH ₂) ₂ OH	24,0±1,15	21ч29	38,9	61,1
IIIд	C ₅ H ₄ N-4	C ₆ H ₄ Br-4	NH ₂	30,7±1,43	25ч35	49,8	50,2
IIIє	C ₅ H ₄ N-4	C ₆ H ₄ CH ₃ -2	NH ₂	38,4±3,56	27ч51	62,3	37,7
IIIж	C ₅ H ₄ N-4	C ₆ H ₄ OCH ₃ -2	Na	25,6±1,07	22ч28	41,4	58,6
IIIз	C ₅ H ₄ N-4	CH ₃	амоній	34,0±1,94	28ч42	55,1	44,9
IIIі	C ₅ H ₄ N-4	C ₆ H ₄ OCH ₃ -2	морфоліній	40,3±1,81	35ч48	65,3	34,7

Таблиця 4 – Анальгетична активність гідразидів (IVа, б), бензиліденгідразидів (IVв, г) 2-(4-R₁-5-R₂-4Н-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)-ацетатних кислот та 1-(2-(4-(диметиламіно)феніл)гідразиніл)-2-(5-(піридин-2-іл)-4-(2-толуіл)-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)етанолу (IVд)



№ сполуки	R ₁	R ₂	R ₃	Кількість судом за 30 хв	Довірчий інтервал при р=0,05	Кількість судом у % до контролю	Анальгетичний ефект
IVа	H	C ₆ H ₅	H ₂	59,9±2,27	48ч66	97,0	3,0
IVб	H	C ₆ H ₄ OCH ₃ -2	H ₂	51,6±2,44	39ч58	83,6	16,4
IVв	H	C ₆ H ₅	CHC ₆ H ₄ OCH ₃ -2	58,3±2,84	45ч70	94,5	5,5
IVг	C ₅ H ₄ N-4	C ₆ H ₅	CHC ₆ H ₃ OCH ₃ -3-OH-4	44,1±3,20	31ч56	71,5	28,5
IVд	C ₅ H ₄ N-4	C ₆ H ₄ CH ₃ -2	CHC ₆ H ₄ N(CH ₃) ₂	36,7±1,82	31ч45	59,5	40,5

Перехід від гідразидів до діацилгідразидів 2-(4-R₁-5-R₂-1,2,4-тріазол-3-ілтію)-ацетатних кислот (Va-г, табл. 5) призводить до зростання анальгетичної активності. При цьому діацилгідразиди (Vб, в) за показниками анальгетичної активності перебувають на рівні еталону порівняння – вольтарену, а сполуки Va, г перевищують активність обох еталонів порівняння.

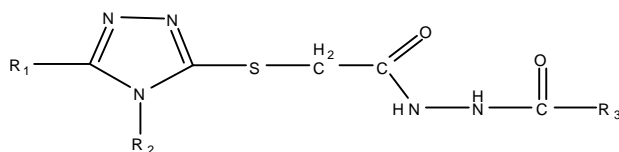
Щодо анальгетичної активності 5-(4-(R)феніл)-4-(2-метоксифеніл)-1,2,4-тріазол-3-іонів (VIa, б, табл. 6) слід відзначити, що наявність у структурі молекули залишку диметил-

амінобензальдегіду (сполука VIб) призводить до підвищення анальгетичної дії.

Конденсація гідразидів 2-(4-R₁-5-R₂-1,2,4-тріазол-3-ілтію)-ацетатних кислот з ізотіоціанатами (сполуки VIIa, б, табл. 7) супроводжується зростанням анальгетичної активності. При цьому наявність в залишку ізотіоціанату метоксифенільного радикала підвищує досліджувану дію.

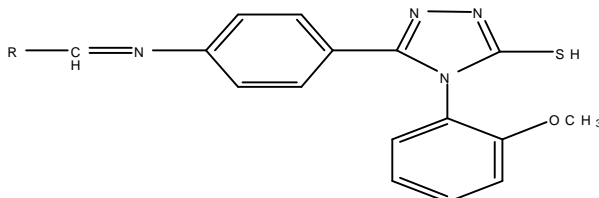
Циклізація 2-(5-R₁-1,2,4-тріазол-3-ілтію)-ацетатних кислот [1] до 5-іліден-2-R₁-тіазоло-(3,2-в)-1,2,4-тріазол-6-онів (сполуки VIIIa, б, табл. 8) не впливає на досліджувану біологічну активність.

Таблиця 5 – Анальгетична активність діацилгідразидів 2-(4-R₁-5-R₂-4Н-1,2,4-тріазол-3-ілтію)-ацетатних кислот (Va-г)



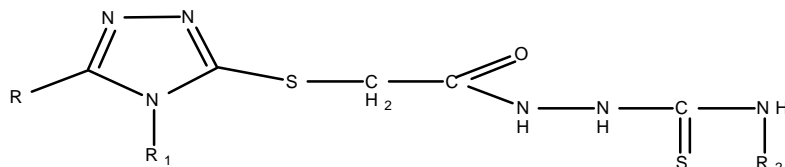
№ сполуки	R ₁	R ₂	R ₃	Кількість судом за 30 хв	Довірчий інтервал при p=0,05	Кількість судом у % до контролю	Анальгетичний ефект
Va	CH ₃	H	C ₅ H ₄ N-3	24,6±1,00	20ч29	39,8	60,2
Vб	C ₆ H ₄ NO ₂ -4	H	C ₅ H ₄ N-4	33,6±1,85	29ч41	54,4	45,6
Vв	2-фуріл	C ₆ H ₄ CH ₃ -2	C ₅ H ₄ N-3	35,3±2,35	27ч42	57,2	42,8
Vг	C ₅ H ₄ N-2	H	C ₅ H ₄ N-4	22,6±1,34	18ч29	36,6	63,4

Таблиця 6 – Анальгетична активність 5-(4-(R)феніл)-4-(2-метоксифеніл)-1,2,4-тріазол-3-іонів (VIa, б)



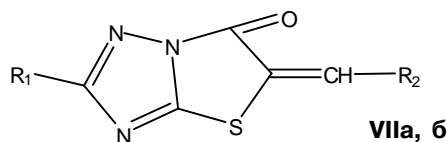
№ сполуки	R	Кількість судом за 30 хв	Довірчий інтервал при p=0,05	Кількість судом у % до контролю	Анальгетичний ефект
VIa	C ₆ H ₃ OCH ₃ -3-OH-4	57,9±2,32	49ч68	93,8	6,2
VIб	C ₆ H ₄ N(CH ₃) ₂	35,9±2,13	29ч44	58,1	41,9

Таблиця 7 – Анальгетична активність N-(R₂)-2-(2-(5-R-4-R₁-1,2,4-тріазол-3-ілтію) ацетил) гідразинокарботіоамідів (IXa, б)



№ сполуки	R	R ₁	R ₂	Кількість судом за 30 хв	Довірчий інтервал при p=0,05	Кількість судом у % до контролю	Анальгетичний ефект
VIIa	C ₅ H ₄ N-4	C ₆ H ₄ OCH ₃ -2	C ₆ H ₅	43,7±2,45	33ч51	70,8	29,2
VIIб	C ₅ H ₄ N-4	C ₆ H ₄ OCH ₃ -2	C ₆ H ₄ OCH ₃ -2	29,0±1,95	21ч35	47,0	53,0

Таблиця 8 – Анальгетична активність похідних тіазоло(3,2-в)-1,2,4-тріазолу



№ сполуки	R ₁	R ₂	Кількість судом за 30 хв	Довірчий інтервал при p=0,05	Кількість судом у % до контролю	Анальгетичний ефект
VIIa	C ₆ H ₄ NO ₂ -2	H ₂	59,7±2,18	49ч67	96,8	3,2
VIIIб	C ₆ H ₄ NO ₂ -4	H ₂	55,6±2,84	42ч62	90,1	9,9

ВИСНОВКИ. 1. Досліджено анальгетичну активність 34 сполук – тіопохідних 1,2,4-тріазол-3-тіонів. Встановлено закономірності відносно будови й анальгетичної активності досліджуваних речовин.

2. Наявність в ядрі 1,2,4-тріазолу 4-піридинового та 2-метоксифенільного замісників, а по тіогрупі 1-метил-4-нітроімідазольного ради-

кала підвищує анальгетичний ефект отриманих речовин.

3. Перехід від тіоацетатних кислот до їх солей, складних естерів, а також перехід від гідразидів до бензиліденгідразидів і діацилгідразидів супроводжуються підвищенням анальгетичної дії.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика: Пер. с англ. Ю.А. Данилова / Под ред. Н.Е. Бузикашвили, Д.В. Самойлова. – М.: Практика, 1999. – 459 с.
2. Доклинические исследования лекарственных средств / Под ред. А.В. Стефанова. – К., 2002. – 567 с.
3. Каплаушенко А.Г. Будова та гостра токсичність аміно- і тіопохідних 1,2,4-тріазолу // Зап. фармац. журн. – 2007. – № 1/2007 (40). – С. 104-107.
4. Каплаушенко А.Г., Панасенко О.І., Книш Є.Г. та ін. Гостра токсичність 5-R-4-R₁-1,2,4-тріазол-3-тіонів та їх S-похідних // Актуальні питання фармац. та мед. науки та практики. – 2007. – № 20. – С. 70-78.
5. Каплаушенко А.Г., Панасенко О.І., Книш Є.Г. та ін. Пошук біологічно активних сполук серед 4-

моно та 4,5-дизаміщених 1,2,4-тріазол-3-тіонів та їх S-похідних // Фармац. часопис. – 2007. – № 1. – С. 32-35.

6. Каплаушенко А.Г. Синтез, фізико-хімічні та біологічні властивості S-похідних 5-(2-, 3-, 4-нітрофеніл)-1,2,4-тріазол-3-тіонів: Дис. ... канд. фармац. наук. – К., 2006. – 201 с.

7. Панасенко О.І. Синтез, перетворення, фізико-хімічні та біологічні властивості похідних 1,2,4-тріазолу: Дис. ... д-ра фармац. наук. – К., 2005. – 396 с.

8. Pat. 6570014 USA, МПК7 C 07 D 487/04. Process for preparing triazolopyrimidine derivatives/Chen Chien-Hsing, Yeh Chun-Lin, Chuang Yu-Hwa. – № 10/134504; Заявл. 30.04.2002; Опубл. 27.05.2003; НПК 544/263.

АНАЛЬГЕТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ТИОПРОИЗВОДНЫХ 5-R₁-4-R₂-1,2,4-ТРИАЗОЛ-3-ТИОНОВ

А.Г. Каплаушенко, А.И. Панасенко, Е.Г. Кныш, Т.А. Панасенко, А.А. Свинтозельский
ЗАПОРОЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

Резюме

Изучена анальгетическая активность 3-алкилтио, 3-гетерилтио, 3-ацилалкилтио, 3-карбоксиметилтио 5-R₁-4-R₂-1,2,4-триазолов и продуктов их химических преобразований. Установлены закономерности относительно строения исследуемых соединений и показателей их анальгетической активности.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: 1,2,4-триазолы, анальгетическая активность.

ANALGETIC ACTIVITY OF 5-R₁-4-R₂-1,2,4-TRIAZOL-3-THIONS THIODERIVATIVES

А.Н. Kaplaushenko, O.I. Panasenko, Ye.H. Knysh, T.O. Panasenko, O.O. Svintozelsky
ZAPORIZHYAN STATE MEDICAL UNIVERSITY

Summary

Analgetic activity of 3-alkylthio, 3-geterilthio, 3-acilalkilthio, 3-carboximetylthio 5-R₁-4-R₂-1,2,4-triazols and products of their chemical transformations have been studied. We have established the regularities between the structure of the studied compounds and analgetic activity indices.

KEY WORDS: 1,2,4-triazols, analgetic activity.

Отримано 12.03.2009 р.

Адреса для листування: А.Г. Каплаушенко, просп. Маяковського, 26, Запоріжжя, 69035, Україна.

ВАЛІДАЦІЯ ТИТРИМЕТРИЧНОЇ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ РОЗЧИНІВ ПІЛОКАРПІНУ ГІДРОХЛОРИДУ АПТЕЧНОГО ВИГОТОВЛЕННЯ

О.А. Євтіфєєва, К.І. Проскуріна, В.А. Георгіянц
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ХАРКІВ

Проведено валідацію титриметричної методики кількісного визначення ізотонічних розчинів пілокарпіну гідрохлориду аптечного виготовлення. Було вивчено такі параметри: діапазон застосування, специфічність, робастність, стабільність у часі, лінійність, правильність, збіжність та відтворюваність у двох різних лабораторіях. Згідно з отриманими експериментальними даними, методика може бути коректно використана в аптечних умовах при розширенні допусків вмісту.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: фармацевтичний аналіз, валідація аргентометричної методики, лікарські форми аптечного виготовлення, пілокарпіну гідрохлорид.

ВСТУП. На цей час препарат пілокарпіну гідрохлориду виготовляють в аптеках у вигляді розчинів 1, 2, 4, 6 % концентрацій.

Для проведення хімічного аналізу лікарських форм аптечного виготовлення потрібно рекомендувати методи, враховуючи доступність необхідного обладнання та витрати на аналіз. Ми вважаємо доцільним провести валідацію методики, яка більш прийнятна для аптечних умов.

У попередніх експериментальних дослідженнях нами запропоновано методику кількісного визначення пілокарпіну гідрохлориду в розчинах методом спектрофотометрії. Також було проведено теоретичне прогнозування невизначеності аналізу Δ_{sp} цим методом для розчинів 1, 2, 4, 6 % концентрацій. Для розчинів 4 та 6 % концентрацій отримані методом спектрофотометрії дані невизначеності значно перевищують граничні вимоги.

З огляду на це, метою нашої роботи була валідація титриметричної методики кількісного визначення пілокарпіну гідрохлориду в розчинах 1, 2, 4 та 6 % концентрацій аптечного виготовлення.

Для проведення дослідження обрано методику кількісного визначення: 1) пілокарпіну гідрохлориду – до 0,5 мл 1 та 6 % або 1 мл 2 % розчину додають 2-3 мл хлороформу та титрують 0,02 М (1 %) або 0,1 М (2 і 6 %) розчином натрію гідроксиду при збовтуванні до отримання рожевого забарвлення водного шару (індикатор – фенолфталеїн); 2) суми пілокарпіну гідрохлориду та натрію гідрохлориду – до 0,5 мл 1 % або 1 мл 2 % розчину додають 1-2 краплі розчину бромфенолового синього, по

краплях розведenu оцтову кислоту до одержання зеленувато-жовтого забарвлення та титрують 0,1 М розчином срібла нітрату до отримання фіолетового забарвлення [1, 7, 8].

Точність титриметричної методики суттєво залежить від коректно підібраних аліквот для аналізу і відповідного мірного посуду. Тобто зменшити загальну похибку аналізу можна шляхом оптимального підбору аліквоти для аналізу і відповідної бюретки [11]. У звичайній аналітичній практиці [10-12] оптимальними для аналізу є бюретки об'ємом 10,00 та 25,00 мл. Для попередження похибок при титруванні наважку речовин, які аналізують, беруть у кількості, щоб на титрування витрачалось не менше 80 % об'єму бюретки. З приводу цього було запропоновано використання інших аліквот у методиках (табл. 1).

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Для проведення досліджень використовували субстанцію пілокарпіну гідрохлориду виробництва Souretech Quimica LTD, серії № 05CD04, яка відповідає вимогам BP 98, USP 24, ДФУ.

Для роботи застосовували мірний посуд класу А, реактиви, які відповідають вимогам ДФУ, аналітичні ваги АВ 204 S/A METTLER TOLEDO, рН-метр РВ-11 фірми "Sartorius AG" (Німеччина) [4].

Для експерименту було виготовлено лікарські форми 1, 2, 4 та 6 % розчинів пілокарпіну гідрохлориду, враховуючи правила аптечної технології, за прописом:

Пілокарпіну гідрохлориду 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 г
Натрію хлориду 0,68; 0,46; 0,02 г (гіпертонічний)

Води до 100 мл

Методика кількісного визначення пілокарпіну гідрохлориду в розчинах. До 2 мл (1 %), 1 мл

Таблиця 1 – Порівняння методик кількісного визначення

Згідно з методикою визначення пілокарпіну гідрохлориду		
Концентрація розчину пілокарпіну гідрохлориду, %	Аліквота розчину для аналізу, мл	Теоретичний об'єм та молярність титрованого розчину NaOH, мл
1	0,5	1,02 0,02 М
2	1	0,82 0,1 М
6	0,5	1,22 0,1 М
Запропоновані аліквоти для аналізу		
1	2	8,17 0,01 М
2	1	8,17 0,01 М
4	1	8,17 0,02 М
6	1	7,36 0,1 М
Згідно з методикою визначення суми пілокарпіну гідрохлориду та натрію хлориду		
Концентрація розчину пілокарпіну гідрохлориду, %	Аліквота розчину для аналізу, мл	Теоретичний об'єм титрованого розчину AgNO ₃ мл (0,1 М)
1	0,5	0,78
2	1	1,6
Запропоновані аліквоти для аналізу		
1	5	7,86
2	5	8,02
4	2	3,95

(2 і 4 %), 3 мл (6 %) розчину пілокарпіну гідрохлориду додають 2-3 мл хлороформу та титрують 0,01 М (1 і 2 %), 0,02 М (4 %), 0,1 М (6 %) розчином натрію гідроксиду при збовтуванні до отримання рожевого забарвлення водного шару (індикатор – фенолфталеїн) (А мл). 1 мл 0,01 М розчину натрію гідроксиду відповідає 2,447 мг, 0,02М – 4,894 мг, 0,1 М – 24,47 мг пілокарпіну гідрохлориду.

Вміст пілокарпіну гідрохлориду розраховували за формулою:

$$X_i = \frac{V_{NaOH} \cdot C_M \cdot S \cdot M_r \cdot K \cdot 100 \cdot V_{м.к.}}{m_n \cdot V_n}$$

де V_{NaOH} – кількість розчину натрію гідроксиду, витраченого на титрування пілокарпіну гідрохлориду, мл; C_M – молярна концентрація натрію гідроксиду; S – стехіометричний коефіцієнт реакції; M_r – молекулярна маса пілокарпіну гідрохлориду; K – поправковий коефіцієнт до молярності розчину натрію гідроксиду; $V_{м.к.}$ – об'єм мірної колби; V_n – об'єм піпетки; m_n – маса наважки для аналізу, г.

Методика кількісного визначення суми галогенідів з метою визначення кількості натрію хлориду в розчинах. До 5 мл розчину пілокарпіну гідрохлориду додають 1-2 краплі розчину бромфенолового синього, по краплях розведену оцтову кислоту до отримання зеленожовтого забарвлення та титрують 0,1 М розчином срібла нітрату до одержання фіолетового забарвлення (Б мл). 1 мл 0,1 М розчину срібла нітрату відповідає 5,844 мг натрію хлориду.

Вміст натрію хлориду (X) у відсотках розраховували за формулою:

$$X = \frac{Y_{AgNO_3} \cdot K \cdot C_M \cdot S \cdot M_r \cdot 100 \cdot V_{м.к.}}{V_n \cdot m_n}$$

де Y_{AgNO_3} – об'єм 0,1 М розчину срібла нітрату, використаний на титрування натрію хлориду, мл; K – поправковий коефіцієнт до молярності 0,1 М розчину срібла нітрату; S – стехіометричний коефіцієнт реакції; M_r – молекулярна маса натрію хлориду, г; $V_{м.к.}$ – об'єм мірної колби; V_n – об'єм піпетки; m_n – маса наважки для аналізу, г.

Кількість 0,1 М розчину срібла нітрату (Y) в мілілітрах, яка пішла на титрування натрію хлориду, розраховували за різницею:

$$Y_{1,0\%} = B - \frac{A}{4}; Y_{2,0\%} = B - \frac{A}{2}; Y_{4,0\%} = B - A,$$

де А – об'єм 0,01 М, 0,02 М або 0,1 М розчину натрію гідроксиду, використаний на титрування пілокарпіну гідрохлориду в модельному розчині, мл; Б – об'єм 0,1 М розчину срібла нітрату, використаний на титрування аліквоти лікарської форми, мл, тобто суми галогенідів.

Приготування модельних-робочих розчинів. Точну наважку пілокарпіну гідрохлориду (m, г) поміщають у мірну колбу місткістю 100 мл, додають точну наважку натрію хлориду відповідно до пропису та доводять водою Р до 100,0 мл.

Для кожного з розчинів, які досліджують, тобто 1, 2, 4 та 6 %, готують п'ять модельних

розчинів з точними наважками 80, 90, 100, 110, 120 % концентрацій відповідно до вмісту в лікарській формі.

Статистичну обробку експериментальних даних проводили відповідно до статті ДФУ "Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту"^N [4].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Молярність стандартних розчинів. Перед початком досліджень проводили перевірку молярності титрованого 0,1 М розчину натрію гідроксиду та 0,1 М розчину срібла нітрату, яку здійснювали в умовах двох різних лабораторій, а також оцінку невизначеності концентрації стандартного розчину (табл. 2). Молярність титрованого розчину натрію гідроксиду визначали за методи-

кою ДФУ[4]. Згідно з вимогами ДФУ, розчини, більш розведені, одержували шляхом розведення попередніх. При розрахунках враховували поправковий коефіцієнт отриманих розчинів, такий самий, як у вихідних розчинів. Тому після розведення стандартизацію 0,01, 0,02 М розчинів натрію гідроксиду не проводили згідно з ДФУ [4]. Молярність розчину срібла нітрату встановлювали за методикою, наведеною в інформаційному листі [3].

Діапазон застосування методики. При проведенні титриметричного кількісного визначення пілокарпіну гідрохлориду було обрано діапазон застосування методики від 80 до 120 %, враховуючи вміст пілокарпіну гідрохлориду в розчинах і вимоги АНД [9] (у нашому випадку для 1 % ± 6 , для 2 % ± 5 %, для 4 % ± 4 %, для 6 % ± 3 %).

Таблиця 2 – Вивчення молярності розчину гідроксиду натрію

Лабораторія № 1				Лабораторія №2		
№ з/п	мн калію гідрофталату	V 0,1 М розчину натрію гідроксиду, мл	K	мн калію гідрофталату	V 0,1 М розчину натрію гідроксиду, мл	K
1	0,4001	19,6	0,9995	0,4007	19,65	0,9985
2	0,4000	19,62	0,9983	0,4002	19,58	1,0008
3	0,4002	19,62	0,9988	0,3998	19,55	1,0013
4	0,4000	19,58	1,0003	0,4008	19,62	1,0003
5	0,4002	19,6	0,9998	0,4001	19,58	1,0005
Середнє значення K			0,9993	Середнє значення K		1,0003
Стандартне відхилення S			0,0008	Стандартне відхилення S		0,0013
RSD (K), %			0,0767	RSD (K), %		0,1326
Відносний довірчий інтервал середнього значення			0,1634	Відносний довірчий інтервал середнього значення		0,2825
Відповідність вимогам ДФУ			відповідає	Відповідність вимогам ДФУ		відповідає

Критерії невизначеності аналітичної методики. Теоретично провели розрахунок критеріїв прийнятності метрологічних характеристик методики аналізу [4, 5].

Невизначеність результатів аналізу. Рекомендації з розрахунку максимально припустимої невизначеності результатів кількісного визначення наведено в ДФУ [4]. Прогнозована невизначеність результатів аналізу не повинна перевищувати максимально припустиму невизначеність аналізу для допусків вмісту ($max \Delta_{45}$). Результати розрахунку прогнозованої невизначеності запропонованих методик титрування наведено у таблиці 3.

Вивчення валідаційних характеристик. Виміри та розрахунки проводили відповідно до рекомендацій [4, 6]. Результати розрахунків представлені у таблиці 4. Результати вивчення лінійності після статистичної обробки вказують на те, що обрана методика дозволяє

контролювати в межах обраного інтервалу концентрацію пілокарпіну гідрохлориду. **Правильність** методики визначає систематична похибка. В нашому випадку показники систематичної похибки для розчинів 2, 4 та 6 % концентрацій перевищують граничні значення відповідного критерію (табл. 4). Ці обставини пов'язані з особливостями об'ємного методу аналізу: використання мірного посуду, який вносить власну похибку, похибка визначення точки еквівалентності та ін. **Збіжність та відтворюваність** методики і умови проведення титрування характеризує відносний довірчий інтервал вмісту пілокарпіну гідрохлориду. Цей показник перевищує граничне значення для розчинів 4 та 6 % концентрацій, що можна пояснити жорсткішими вимогами специфікації (більш жорстке нормування вмісту) для цих розчинів, не враховуючи можливостей аналітичних методів аналізу.

Таблиця 3 – Невизначеність методик аналізу

Речовина, яку аналізують	Значення невизначеності методик, %			
	1	2	4	6
Пілокарпіну гідрохлорид	0,75	0,82	0,71	1,07
Натрію хлорид	0,75	0,75	0,80	–

Таблиця 4 – Валідаційні характеристики методики визначення пілокарпіну гідрохлориду у випробуваних розчинах

Розчин	Правильність та збіжність		Лінійність		Відтворюваність	
	Критерії прийнятності, %	Експериментальні дані	Критерії прийнятності, %	Експериментальні дані	Критерії прийнятності, %	Експериментальні дані
1	max Δ_{AS} , %=1,92	1,40	RSD ₀ %=1,0842	0,7630	max Δ_{AS} , %=1,92	1,50
	max δ , %=0,61	0,38	R _c =0,9973	0,9988		
2	max Δ_{AS} , %=1,60	1,23	RSD ₀ %=0,9035	0,6759	max Δ_{AS} , %=1,60	1,29
	max δ , %=0,51	0,71	R _c =0,9981	0,9990		
4	max Δ_{AS} , %=1,28	1,22	RSD ₀ %= 0,7228	0,6659	max Δ_{AS} , %=1,28	1,49
	max δ , %=0,41	0,40	R _c =0,9988	0,9990		
6	max Δ_{AS} , %=0,96	1,29	RSD ₀ %=0,5421	0,7179	max Δ_{AS} , %=0,96	1,20

Кількісне визначення вмісту натрію хлориду методом аргентометрії проводили за різницею після титрування суми галогенідів. Було вивчено метрологічні характеристики методи-

ки титрування правильність та прецизійність на рівні збіжності та відтворюваності. В таблиці 5 наведено експериментальні дані, отримані після статистичної обробки за вимогами ДФУ [4].

Таблиця 5 – Валідаційні характеристики методики визначення натрію хлориду у випробуваних розчинах

Розчин	Правильність та збіжність		Відтворюваність	
	Критерії прийнятності, %	Експериментальні дані	Критерії прийнятності, %	Експериментальні дані
1	max Δ_{AS} , %=2,24	0,61	max Δ_{AS} , %=2,24	0,92
	max δ , %=0,72	0,59		
2	max Δ_{AS} , %=2,24	1,56	max Δ_{AS} , %=2,24	1,88
	max δ , %=0,72	0,46		
4	max Δ_{AS} , %=2,24	1,45	max Δ_{AS} , %=2,24	1,70
	max δ , %=0,72	0,90		

ВИСНОВКИ. 1. Здійснено процедуру валідації методики кількісного визначення пілокарпіну гідрохлориду в розчинах за валідаційними характеристиками (лінійність, правильність, збіжність, відтворюваність) відповідно до вимог ДФУ.

2. Апробована методика може бути використана при аналізі 1 % розчину пілокарпіну

гідрохлориду в умовах аптек та лабораторій з контролю якості лікарських засобів. Для 2, 4 та 6 % розчинів отримані метрологічні характеристики методики свідчать про можливість застосування титриметричного методу для аналізу даної лікарської форми в умовах аптек, але при розширенні допусків вмісту.

ЛІТЕРАТУРА

1. Беликов В.Г. Фармацевтическая химия: В 2 т. – 2-е изд. – М.: Высш. шк., 1993. – Т. 1. – 432 с.; Т. 2; Специальная фармацевтическая химия. – Пятигорск, 1996. – 608 с.

2. Вимоги до виготовлення стерильних лікарських засобів в умовах аптек / За ред. О.І. Тихонова, Т.Г. Ярних. – К.: МОЗ України, 2005. – 76 с.

3. Георгіянц В.А., Євтіфєєва О.А., Бисага Є.І., Проскуріна К.І., Бочкарьова А.Ю. Контроль якості (виз-

начення молярності) стандартних (титрованих) розчинів в умовах аптек та лабораторій з контролю якості лікарських засобів: Інформаційний лист. – К.: МОЗ України, 2009. – 10 с.

4. Державна Фармакопея України / Державне підприємство “Науково-експертний фармакопейний центр”. – 1-ше вид. – Харків: РІРЕГ, 2001. – 556 с.; Доповнення 1. – Харків: РІРЕГ, 2004. – 520 с.; Доповнення 2. – Харків: РІРЕГ, 2008. – 608 с.

5. Евтифеева О.А., Георгиянц В.А. Стандартизованная процедура валидации методик количественного определения экстреморальных лекарственных средств в условиях аптек и лабораторий по контролю качества // Фармаком. – 2007. – № 1. – С. 69-81.

6. Евтифеева О.А., Георгиянц В.А. Титриметрический метод анализа в условиях аптек и лабораторий по контролю качества лекарственных средств: проблемы и подходы // Фармаком. – 2008. – № 2. – С. 65-77.

7. Кулешова М.И., Гусева Л.Н., Сивицкая О.К. Анализ лекарственных форм, изготовляемых в аптеках. – М.: Медицина, 1989. – 228 с.

8. Максютин Н.П., Каган Ф.Е., Кириченко Л.А., Митченко Ф.А. Методы анализа лекарств. – К.: Здоров'я, 1984. – 224 с.

9. Про затвердження Правил виробництва (виготовлення) лікарських засобів в умовах аптеки: Наказ МОЗ України № 626 від 15.12.2004 р. (із змінами та доповненнями) // Юридичні аспекти фармації. – Х., 2006. – Т. 3. – С. 49-59.

10. European Pharmacopoeia. – 5th ed. – Electronic version. – 2779 p.

11. Pharmaceutical analysis / Takeru Higuchi and Einar Brochmann-Hanssen. – New York–London–Sydney: INTERSCIENCE PUBLISHERS, 2002. – P. 574-578.

12. Technical Guide for the Elaboration of Monographs, European Pharmacopoeia. – 4th Edition. – 2005. – 67 p.

ВАЛИДАЦИЯ ТИТРИМЕТРИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ РАСТВОРОВ ПИЛОКАРПИНА ГИДРОХЛОРИДА АПТЕЧНОГО ИЗГОТОВЛЕНИЯ

О.А. Евтифеева, К.И. Проскурина, В.А. Георгиянц
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

Резюме

Проведена валидация титриметрической методики количественного определения аптечной лекарственной формы на основе пилокарпина гидрохлорида. Были изучены такие параметры: диапазон применения, специфичность, робастность, стабильность во времени, линейность, правильность, сходимост и воспроизводимость в условиях двух различных лабораторий. Согласно полученным экспериментальным данным, методика может быть корректно использована в условиях аптек при расширении допусков содержания.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фармацевтический анализ, валидация аргентометрической методики, лекарственные формы аптечного изготовления, пилокарпина гидрохлорид.

VALIDATION OF TITRIMETRIC METHOD OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF PILOCARPINE HYDROCHLORIDE IN SOLUTIONS OF PHARMACY PRODUCTION

O.A. Yevtifeyeva, K.I. Proskurina, V.A. Georgiyants
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

Summary

Validation of titrimetric method of the quantitative determination of pharmacy medicinal form with pilocarpine hydrochloride has been conducted. Investigated medicinal form is made in a pharmacy for emergency and it is most often used in different individual prescriptions. The validation has been conducted under the scheme which is resulted in the State Pharmacopoeia of Ukraine (SPU). Such parameters as range of application, specificity, linearity, repeatability, accuracy and reproducibility were studied in the conditions of two different laboratories, that has allowed to make a conclusion about suitability of use of the given method in conditions of drugstores and laboratories if the limits of content will be widen.

KEY WORDS: pharmaceutical analysis, validation of analytical methods, extemporal prescriptions, pilocarpine hydrochloride.

Отримано 18.05.2009 р.

Адреса для листування: О.А. Євтіфеева, Національний фармацевтичний університет, вул. Пушкінська, 53, Харків, 61002, Україна.

ВПЛИВ S-ЗАМІЩЕНИХ ХІНАЗОЛІНУ НА ПОКАЗНИКИ ОКИСНЮВАЛЬНОЇ МОДИФІКАЦІЇ БІЛКА *IN VITRO* ЗА УМОВ ТОКСИЧНОЇ ДІЇ АКТИВНИХ ФОРМ NO

С.А. Моргунцова

ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

У роботі досліджено антиоксидантну активність деяких S-похідних хіназоліну в досліджах *in vitro* та показано, що вони проявляють високу ефективність на різноманітних моделях ініціювання вільнорадикального окиснення. При порівняльному аналізі структури досліджуваних речовин та вираження їх антиоксидантного ефекту можна передбачити, що однією з вирішальних характеристик для реалізації біологічної дії є замісник по атому сульфуру. Максимум ефективної концентрації досліджуваних даними методами антиоксидантів склав 10^6 моль/л.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: нітрозуючий стрес, антиоксидантна активність, S-заміщені хіназоліну, активні форми кисню, окиснювальна модифікація білка, рівень гомоцистеїну.

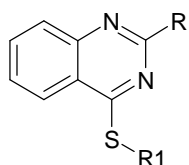
ВСТУП. Останнім часом у контексті розуміння ролі активних форм монооксиду нітрогену (NO) і його цитотоксичних дериватів у патогенезі захворювань серцево-судинної системи, нейродеструктивних захворювань увагу фармакологів привертають препарати, дія яких направлена не тільки на обмеження утворення NO, але й на інактивацію його агресивних форм. Відомо, що NO під впливом активних форм кисню (супероксиду, гідроксил-радикала) може перетворюватися в пероксинітритну кислоту (ONOOH), пероксинітрит (ONOO⁻), іон нітрозонію (NO⁺), які на фоні антиоксидантного дефіциту нітروزують фенільні групи білкових фрагментів рецепторів, іонних каналів, взаємодіють з сульфгідрильними групами ферментів та чинників транскрипції, транспортних білків, мембранних пор, вступають у реакцію з металопротеїдами активних центрів ферментів, ініціюють експресію проапоптотичних білків і прозапальних цитокінів [1-5, 7-9, 11, 14]. Такий стан характеризується як нітрозуючий стрес [7, 11]. Результатами таких порушень є розлад механізму передачі сигналу в центральну нервову систему, ініціація апоптозу, локальні запальні реакції, порушення процесів трансляції та транскрипції [1-3, 7-9]. Крім того, цитотоксичні деривати NO порушують тіодисульфідну рівновагу в клітині, інгібують активність цистатіонін b-синтетази, знижують рівень глутатіону, цистеїну і збільшують рівень гомоцистеїну, що

підсилює явища ендотеліальної дисфункції [3, 8, 14]. Особливий інтерес щодо створення препаратів антиоксидантної дії, які обмежують негативну дію нітрозуючого стресу на клітину, викликають похідні хіназоліну. В ранніх роботах було встановлено, що S-заміщені хіназоліну проявляють антиоксидантну дію за умов ініціації активних форм кисню і монооксиду нітрогену *in vitro* [10, 12, 13].

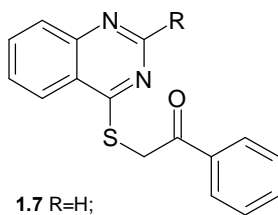
Метою даного дослідження було вивчення антиоксидантних властивостей S-заміщених хіназоліну на моделі нітрозуючого стресу *in vitro* за впливом на показники окиснювальної модифікації білка і рівень гомоцистеїну.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Оцінку антиоксидантної активності (АОА) сполук проводили на моделі окиснювальної модифікації білка (ОМБ) за умов моделювання нітрозуючого стресу *in vitro* [11]. Нітрозуючий стрес *in vitro* моделювали шляхом внесення в інкубаційну суміш динітрозольного комплексу феруму з цистеїном (DNIC), який при хімічних перетвореннях індукуює такі цитотоксичні форми монооксиду нітрогену, як пероксинітритна кислота, пероксинітрит, іон-нітрозонію [1]. У роботі був досліджений ряд похідних 2-R-4-тіохіназоліну (схема 1), синтезованих на кафедрі фармацевтичної хімії Запорізького державного медичного університету (зав. кафедри д-р фармац. наук, проф. І.А. Мазур), які проявляють високу антиоксидантну активність за умов ініціації супероксиду і монооксиду нітрогену *in vitro* [12, 13].

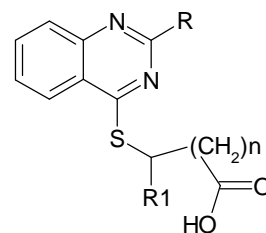
© С.А. Моргунцова, 2009.



1.1 R=R1=H;
2.1 R=CH₃, R1=H;
3.1 R=R1=SH



1.7 R=H;
2.7 R=CH₃



1.2 R=R1=H, n=0; 1.3 R=H, R1=CH₃, n=0;
1.4 R=H, R1=C₂H₅, n=0; 1.5 R=H, R1=i-C₃H₇, n=0;
1.6 R=H, R1=H, n=1; 2.2 R=CH₃, R1=H, n=0;
2.3 R=CH₃, R1=CH₃, n=0; 2.4 R=CH₃, R1=C₂H₅, n=0;
2.5 R=CH₃, R1=i-C₃H₇, n=0; 2.6 R=CH₃, R1=H, n=1.

Схема 1. Принципова схема будови похідних 2-R-4-тіохіназоліну.

Реакцію ОМБ проводили в гомогенаті мозку щурів лінії Вістар. До 0,25 г гомогенату тканини додавали 7 мл 0,5 М фосфатного буферного розчину (температура розчину – 5 °С) і центрифугували при 11 000 г 30 хв. З метою моделювання нітрозуючого стресу *in vitro* до 0,7 мл супернатанту (вміст білка – 500 мкг/мл) додавали 100 мкМ DNIC й інкубували 2 год при температурі 37 °С. Потім додавали 1 мл 25 % розчину кислоти трихлорацетатної і центрифугували 30 хв із частотою 3000 об./хв. До 0,5 мл надосадової рідини додавали 12,0 мл 0,9 % розчину натрію хлориду й вимірювали оптичну густину за довжини хвилі 254, 272 і 280 нм, використовуючи як компенсуючий розчин 0,5 М фосфатний буферний розчин. АОА (%) визначали за ступенем гальмування дефрагментації білка. До осаду, який одержали після центрифугування, додавали 1 мл 2,2 % розчину 2,4-динітрофенілгідразину, інкубували 1 год при температурі 37 °С, центрифугували 10 хв при 3000 об./хв. Осад промивали 3 мл етилацетату, розчиняли в 3 мл 50 % розчину карбаміду, додавали 1 краплю 7 % розчину кислоти хлоридної та розводили дистильованою водою 1:12. Визначали оптичну густину одержаного розчину за довжини хвилі 274 і 363 нм, використовуючи як компенсуючий розчин 0,5 М фосфатний буфер. АОА (%) визначали за гальмуванням утворення карбонільних (АФГ, 274 нм) і карбоксильних (КФГ, 363 нм) груп. В окремій пробі інкубаційного середовища визначали концентрацію гомоцистеїну. Принцип методу оснований на реакції гомоцистеїну і L-серину з формуванням цистатіоніну, що каталізується цистатіонін b-синтетазою. Потім фермент цистатіонін b-ліаза каталізує перетворення цистатіоніну в гомоцистеїн, піруват й аміак. Швидкість утворення пірувату може бути виміряна при додаванні лактатдегідрогенази та NADH в реакційну суміш і прямо пропорційна концентрації гомоцистеїну [1]. 0,8 мл інкуба-

ційної суміші після інкубації з DNIC вносили в реакційну суміш, що містила L-серин, цистатіонін b-синтетазу, цистатіонін b-ліазу на 1,4 мл трис-HCl-амінометанового буфера з рН 7,6, й інкубували 5 хв при температурі 37 °С, потім додавали 0,05 мл лактатдегідрогенази (700 од./мг) та 0,05 М NADH і спектрофотометрували при 340 нм протягом 4 хв.

Статистичний аналіз даних проводили згідно з програмами "Statistic for Windows". Для оцінки достовірності відмінності між групами використовували критерій Манна-Уїтні.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Як видно з даних, наведених у таблицях 1-3, досліджувані сполуки й еталонні препарати – тіотриазолін, ацетилцистеїн і метіонін проявляють антиоксидантну дію за умов моделювання нітрозуючого стресу *in vitro* при дії DNIC на білок супернатанту мозку щурів. Сполуки й еталонні препарати мали антиоксидантну активність у діапазоні концентрації 10⁻³-10⁹ М з максимальним проявом ефекту в концентрації 10⁶ М.

Антиоксидантна дія досліджуваних сполук при DNIC-ініційованому нітрозуючому стресі проявлялася в гальмуванні утворення карбонільних і карбоксильних продуктів окиснювальної модифікації білка – АФГ і КФГ (табл. 1, 2), а також зниженні утворення гомоцистеїну (табл. 3). Докладний кількісний аналіз взаємозв'язку "структура – активність" в досліджуваному ряді сполук ми плануємо провести після детального вивчення розрахункових і експериментальних дескрипторів відповідних похідних, але вже на цьому етапі одержані результати дають нам змогу зробити деякі висновки щодо характеру наявних взаємозв'язків.

Більшість досліджених сполук проявляла АОА, яка за силою дії перевищувала або конкурувала з активністю еталонних препаратів. Особливий інтерес викликали похідні, що

мали в четвертому положенні хіназоліну сульфур, зв'язаний із залишком фенацилу (1.7, 2.7), масляної (1.4, 2.4) або ізовалеріанової (1.5, 2.5)

кислоти. Похідні 2-метил-4-тіохіназоліну проявляли менш виражену активність, ніж відповідні S-похідні 4-тіохіназоліну.

Таблиця 1 – Вплив похідних 2-R-4-тіохіназоліну на рівень маркерних продуктів ОМБ (довжина хвилі – 274 нм) у гомогенаті мозку щурів за умов нітрузуючого стресу *in vitro* (n=10)

Сполука	10 ⁻³ моль/л		10 ⁻⁶ моль/л		10 ⁻⁹ моль/л	
	А	АОА, %	А	АОА, %	А	АОА, %
1.1	0,71±0,03	11,25	0,58±0,07*	27,5	0,70±0,08	12,5
1.2	0,68±0,13	15,0	0,65±0,16	18,75	0,78±0,04	2,5
1.3	0,71±0,21	11,25	0,51±0,09*	36,25	0,62±0,17*	22,5
1.4	0,766±0,12	4,25	0,45±0,04*	43,75	0,76±0,06	5,0
1.5	0,58±0,05*	27,5	0,41±0,07*	48,75	0,61±0,08*	23,75
1.6	0,71±0,04	11,25	0,64±0,10	20,0	0,79±0,02	1,25
1.7	0,62±0,11*	22,5	0,41±0,02*	48,75	0,54±0,20*	32,5
2.1	0,77±0,03	3,75	0,60±0,08	25,0	0,80±0,07	0
2.2	0,87±0,09	-8,75	0,53±0,14*	33,75	0,75±0,03	6,25
2.3	0,63±0,02	21,25	0,54±0,17*	32,5	0,76±0,06	5,0
2.4	0,73±0,11	8,75	0,48±0,16*	40,0	0,68±0,08	15,0
2.5	0,70±0,11	12,5	0,54±0,10*	32,5	0,78±0,08	2,5
2.6	0,80±0,18	0	0,56±0,12*	30,0	0,72±0,12	10,0
2.7	0,67±0,23	16,25	0,54±0,14*	32,5	0,68±0,09	15,0
3.1	0,80±0,09	0	0,70±0,31	12,5	0,80±0,06	0
Тіотриазолін	0,48±0,06*	40,0	0,46±0,09*	42,5	0,58±0,08*	27,5
Метіонін	0,72±0,08	10,0	0,58±0,02*	27,5	0,80±0,08	0
Ацетилцистеїн	0,58±0,06*	27,5	0,47±0,08*	41,25	0,70±0,05	12,5
Контроль (DNIC 100 мкМ)	0,80±0,09		0,80±0,09		0,80±0,09	
Інтакт	0,37±0,03		0,37±0,03*		0,37±0,03*	

Примітка. * – достовірність відмінності (p<0,05) відносно групи контролю.

Таблиця 2 – Вплив похідних 2-R-4-тіохіназоліну на рівень маркерних продуктів ОМБ (довжина хвилі – 363 нм) у гомогенаті мозку щурів за умов нітрузуючого стресу *in vitro* (n=10)

Сполука	10 ⁻³ моль/л		10 ⁻⁶ моль/л		10 ⁻⁹ моль/л	
	А	АОА, %	А	АОА, %	А	АОА, %
1.1	0,28±0,03*	37,77	0,23±0,02*	48,88	0,30±0,02*	33,33
1.2	0,30±0,04*	33,33	0,25±0,09*	44,44	0,33±0,04*	26,66
1.3	0,16±0,04*	64,44	0,12±0,01*	73,33	0,20±0,03*	55,55
1.4	0,22±0,03*	51,11	0,15±0,01*	66,66	0,25±0,01*	44,44
1.5	0,19±0,03*	57,77	0,14±0,01*	68,88	0,18±0,02*	60,0
1.6	0,38±0,04	15,55	0,32±0,07*	28,88	0,44±0,03	2,22
1.7	0,15±0,02*	66,66	0,09±0,001*	80,0	0,18±0,01*	60,0
2.1	0,44±0,02	2,22	0,35±0,06	22,22	0,45±0,02	0
2.2	0,36±0,05	20,0	0,28±0,03*	37,77	0,32±0,03	28,88
2.3	0,40±0,04	11,11	0,31±0,07*	31,11	0,43±0,04	4,44
2.4	0,30±0,04*	33,33	0,21±0,04*	53,33	0,27±0,03*	40,0
2.5	0,41±0,02	8,88	0,30±0,05*	33,33	0,41±0,03*	8,88
2.6	0,22±0,09*	51,11	0,14±0,03*	68,88	0,18±0,02*	60,0
2.7	0,37±0,09	17,77	0,27±0,06*	40,0	0,33±0,02*	26,66
3.1	0,41±0,03	8,88	0,32±0,04*	28,88	0,42±0,03	6,66
Тіотриазолін	0,23±0,02*	48,88	0,14±0,02*	68,88	0,20±0,03*	55,55
Метіонін	0,30±0,02*	33,33	0,28±0,04*	37,77	0,34±0,02*	24,44
Ацетилцистеїн	0,28±0,02*	37,77	0,20±0,06*	55,55	0,32±0,03*	28,88
Контроль	0,45±0,02		0,45±0,02		0,45±0,02	
Інтакт	0,15±0,01		0,15±0,01		0,15±0,01	

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Таблиця 3 – Вплив похідних 2-R-4-тіохіназоліну на вміст гомоцистеїну в гомогенаті мозку щурів за умов нітрозуючого стресу *in vitro* (n=10)

Сполука	10 ⁻³ моль/л		10 ⁻⁶ моль/л		10 ⁻⁹ моль/л	
	мкМ/г	АОА, %	мкМ/г	АОА, %	мкМ/г	АОА, %
1.1	28,5±0,11	12,84	25,0±0,32*	23,55	22,2±0,21*	32,11
1.2	20,0±0,14*	38,84	23,7±0,12*	27,53	17,8±0,33*	45,57
1.3	29,6±0,41	9,48	30,1±0,17	7,95	30,1±0,22	7,95
1.4	16,6±0,31*	49,24	20,1±0,17*	38,53	17,2±0,19*	47,4
1.5	18,2±0,35*	44,34	28,1±0,37*	14,37	15,2±0,11*	53,52
1.6	32,0±0,15	2,14	32,0±0,22	2,14	17,1±0,33*	47,71
1.7	11,8±0,12*	63,92	8,32±0,07*	74,56	14,7±0,07*	55,05
2.1	23,4±0,27*	27,52	26,4±0,11*	19,27	17,5±0,22*	46,48
2.2	16,4±0,15*	49,85	13,7±0,14*	58,1	14,5±0,18*	55,66
2.3	25,0±0,12	23,55	27,7±0,11	15,29	29,0±0,23	11,31
2.4	32,7±0,43	0	27,6±0,14	15,59	26,7±0,22	18,35
2.5	32,0±0,21	2,14	32,0±0,55	2,14	28,7±0,39	12,23
2.6	21,2±0,28*	35,17	30,1±0,37	7,95	24,6±0,23*	24,77
2.7	24,5±0,14*	25,08	22,7±0,12*	30,58	16,4±0,25*	49,85
3.1	17,9±0,12*	45,26	18,5±0,16*	43,43	14,7±0,23*	55,05
Тіотриазолін	15,7±0,19*	51,99	12,4±0,12*	62,08	17,4±0,22*	46,79
Метіонін	21,2±0,21*	35,17	19,0±0,3*	41,89	22,2±0,26*	32,11
Ацетилцистеїн	17,0±0,26*	48,01	0,228±0,03*	30,28	22,3±0,37*	31,8
Контроль	32,7±0,24		32,7±0,24		32,7±0,24	
Інтакт	7,22±0,24		7,22±0,24		7,22±0,24	

Окремо слід зазначити факт залежності АОА від концентрації. Практично у всіх спостережуваних випадках (як для досліджуваних сполук, так і для еталонів) ефективною була концентрація речовини 10⁻⁶ моль/л. Зниження антиоксидантної активності сполук при зменшенні їх концентрації не вимагає пояснення, а ось факт значного зниження активності при підвищенні їх концентрації цікавий і може пояснюватися або прооксидантною активністю досліджуваних речовин в такій концентрації (збільшення відновних потенціалів та ініціація реакції Фентона), або наявністю власного поглинання при такій довжині хвилі, що призводить до систематичної помилки експерименту. Тіольні антиоксиданти, відібрані нами як еталони порівняння, проявляли антиоксидантну активність за умов DNIC-залежного нітрозуючого стресу в тій самій залежності "концентрація – ефект", що й досліджувані сполуки. Такий факт свідчить про наявність у досліджуваних сполук загального для всіх тіолів механізму дії при нітрозуючому стресі, зумовленому надлишком цитотоксичних, агресивних дериватів монооксиду нітрогену.

Що стосується АОА тіотриазоліну, то вона полягає в реактивації антиоксидантних ферментів, зниженні маркерних продуктів нітрозуючого й оксидативного стресу. Тіотриазолін

здатний інактивувати пероксинітрит, зберігаючи тіодисульфідну рівновагу [1-3, 7-9, 14]. Тіотриазолін попереджує розвиток порушення рівноваги тіосульфідної системи при гіперпродукції АФК і монооксиду нітрогену [1, 8], забезпечуючи передачу клітинного сигналу через рецепторно-іоноформний комплекс, зберігаючи активність білків, ферментів, чинників транскрипції. N-АЦЦ здатний зв'язувати NO[•] або NO⁺ з утворенням менш активних нітросполук, є конкурентом за АФК із SH-групами білків, знижуючи їх модифікацію та утворення цитотоксичних нітротіольних фрагментів білкових молекул [16]. Метіонін за механізмом антиоксидантної дії схожий на ацетилцистеїн.

На основі одержаних даних можна зробити висновок про те, що досліджувані речовини є перспективними з точки зору пошуку препаратів з антиоксидантним механізмом дії. Наше подальше завдання полягає в детальному вивченні кореляцій "структура – активність", що дасть змогу виявити сполуку з найбільш оптимальними характеристиками.

ВИСНОВКИ. 1. S-заміщені хіназоліну проявляють високу антиоксидантну активність на різних моделях ініціації вільнорадикального окиснення в дослідіах *in vitro*, знижуючи утво

рення карбонільних і карбоксильних продуктів окиснювальної модифікації білка й окисненої форми цистеїну – гомоцистеїну, за силою дії перевищуючи або конкуруючи з еталонними тільними антиоксидантами.

2. Серед досліджених похідних сполуки 1.3-1.5, 1.7 проявляють найбільшу антиоксидантну активність в розведенні 10^6 моль/л. Ця ж концентрація є найефективнішою і для препаратів порівняння.

3. Порівняльний аналіз активності досліджених речовин і їх структури дозволяє зробити припущення про те, що величина спостережуваного в даному експерименті антиоксидантного ефекту може залежати від внеску таких замісників, як фенацил, масляна або ізовалеріанова кислота.

4. Відповідні похідні хіназоліну є перспективним класом у пошуку нових лікарських препаратів нейропротекторного профілю.

ЛІТЕРАТУРА

1. Беленичев И.Ф., Губский Ю.И., Левицкий Е.Л. и др. Токсикологические последствия окислительной модификации белка при различных патологических состояниях // Совр. пробл. токсикол. – 2005. – № 3. – С. 20-27.

2. Беленичев И.Ф., Левицкий Е.Л., Губский Ю.И. и др. Антиоксидантная система защиты организма // Совр. пробл. токсикол. – 2002. – № 3. – С. 24-31.

3. Беленичев И.Ф., Левицкий Е.Л., Павлов С.В. и др. Роль гена раннего реагирования C-Fos в норме и в нейродеструктивной токсической патологии. Возможности фармакокоррекции нейропептидными лекарственными средствами // Совр. пробл. токсикол. – 2008. – № 1. – С. 17-27.

4. Беленичев И.Ф., Коваленко С.И., Карпенко О.В. Дослідження антиоксидантної та антирадикальної активності іліденгідразидів S-(4-хіназоліл)-меркаптооцтової кислоти *in vitro* та в умовах модельних судом // Клін. фармація. – 2003. – 7, № 1. – С. 53-57.

5. Беленичев И.Ф., Мазур I.A., Коваленко С.И. та ін. Нейропротективна дія препарату "Ноотрил" (розчин для ін'єкцій) при модельних судомних станах // Експерим. фізіол. біохім. – 2003. – № 1. – С. 7-10.

6. Биленко М.В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов. – М.: Медицина, 1986. – 326 с.

7. Болдырев А.А. Роль активных форм кислорода в функциональной активности нейронов // Усп. физиол. наук. – 2005. – 34, № 3. – С. 21-34.

8. Викторов И.В. Роль оксида азота и других свободных радикалов в развитии ишемии головного мозга // Вестн. РАМН. – 2000. – № 4. – С. 5-9.

9. Губский Ю.И., Беленичев И.Ф., Левицкий Е.Л. и др. Роль активных форм кислорода в функцио-

нальной активности MAP-киназного каскада, глобальных факторов транскрипции и развития апоптоза (обзор литературы и собственных исследований) // Журн. АМН Украины. – 2008. – № 2. – С. 203-217.

10. Губський Ю.І., Беленічев І.Ф., Левицький Є.Л. та ін. Антиоксидантна активність конденсованих похідних [1,2,4]-триазолінів в умовах нітрозуючого стресу // Укр. біохім. журн. – 2007. – 79, № 5. – С. 159-164.

11. Губський Ю.І., Дунаєв В.В., Беленічев І.Ф. та ін. Методи оцінки антиоксидантних властивостей фізіологічно активних сполук при ініціюванні вільнорадикальних процесів *in vitro*: Методичні рекомендації. –К.: ДФЦ МОЗ України, 2002. – 26 с.

12. Губський Ю.І., Левицький Є.Л., Беленічев І.Ф. та ін. Геномо- та мембранозахисна дія нових N-вмісних похідних хіназолінів *in vivo* за умов інтоксикації щурів тетрахлорметаном // Совр. пробл. токсикол. – 2007. – № 4. – С. 25-30.

13. Губський Ю.І., Левицький Є.Л., Горюшко Г.Г. та ін. Геномозахисні властивості S-вмісних похідних хіназолонів – сполук НКС-153, NC-109 за умов отруєння тетрахлорметаном. Дослідження *in vivo* // Мед. хімія. – 2007. – 9, № 4. – С. 5-10.

14. Машковский М.Д. Лекарственные средства. – М.: ООО "Новая волна", 2002. – Т. 1. – 539 с.; Т. 2. – 590 с.

15. Edschiuch C., Gilbert D., Colton C. The neurobiology of NO and OH⁻ // N.Y. Acad. Sci. – 1994. – 140 p.

16. Szobo C. Physiological and pathophysiological role of nitric oxide in the central nervous system // Brain Res. Bull. – 1996. – № 41. – P. 131-141.

ВЛИЯНИЕ S-ЗАМЕЩЕННЫХ ХИНАЗОЛИНА НА ПОКАЗАТЕЛИ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКА *IN VITRO* В УСЛОВИЯХ ТОКСИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ NO

С.А. Моргунова

ЗАПОРОЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

Резюме

В работе исследована антиоксидантная активность некоторых S-производных хиनाзолина в опытах *in vitro* и показано, что они проявляют высокую эффективность на различных моделях инициирования свободнорадикального окисления. При сравнительном анализе структуры исследуемых веществ и выраженности их антиоксидантного эффекта можно предположить, что одной из решающих характеристик для реализации биологического действия является заместитель по атому серы. Максимум эффективной концентрации исследуемых данными методами антиоксидантов составил 10^6 моль/л.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: нитрозирующий стресс, антиоксидантная активность, S-замещенные хи-назолина, активные формы кислорода, окислительная модификация белка, уровень гомоцистеина.

INFLUENCE OF S-SUBSTITUTED QUINAZOLINES ON *IN VITRO* PROTEIN OXIDATIVE MODIFICATION PARAMETERS IN CONDITIONS OF TOXIC ACTION OF NO ACTIVE FORMS

S.A. Morhuntsova

ZAPORIZHYAN STATE MEDICAL UNIVERSITY

Summary

Antioxidant activity of certain quinazoline S-derivatives was investigated *in vitro*, and their high effectiveness in different free-radical oxidation models was revealed. After structure-activity comparative analysis it was made an assumption that lipophilicity is a critical property that affects on biological activity value. The most effective concentration of investigated antioxidants was 10^6 mol/l.

KEY WORDS: nitrozing stress, antioxidant activity, S-derivatives for quinazolines, active forms of oxygen, oxidizing modification of protein, level of homocystein.

Отримано 12.11.2009 р.

Адреса для листування: С.А. Моргунова, Запорізький державний медичний університет, просп. Маяковського, 26, Запоріжжя, 69035, Україна.

РОЗРОБКА СПОСОБУ ТА ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИК КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ МАГНІЮ АСПАРАГІНАТУ В ТАБЛЕТКАХ

Ю.В. Тимошик¹, М.М. Васенда², М.М. Михалків², В.В. Петренко¹, Т.А. Грошовий²
 ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ¹
 ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО²

Розроблено високочутливу методику кількісного визначення магнію аспарагінату за амінокислотою частиною молекули в таблетках на основі реакції з алоксаном в середовищі диметилформаміду. Наведено статистично обґрунтовану процедуру валідації, яку здійснювали за схемою відповідно до ДФУ з вивченням таких параметрів, як діапазон застосування, невизначеність аналітичної методики, лінійність, робастність, правильність, збіжність.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: статистичне планування експерименту, магнію аспарагінат, алоксан, спектрофотометрія, кількісне визначення, валідація аналітичної методики.

ВСТУП. Одним з основних макроелементів в організмі людини є магній, який бере активну участь в метаболізмі, активує близько 300 ферментативних реакцій [4, 6, 8]. При лікуванні різноманітних патологій (серцево-судинної, ендокринної, психоневрологічної) та при вагітності [1, 2] пропонують використовувати препарати, що містять солі магнію, як однокомпонентні, так і в поєднанні з вітамінами або іншими макроелементами.

Нами було отримано таблетковий препарат, що містить сіль магнію аспарагінату. Відомо, що для ідентифікації магнію використовують хімічні методи із застосуванням осадових, кольорових реакцій, для кількісного його визначення в препаратах – метод комплексонометрії, при якому іони Mg^{2+} відтитровують розчином натрію едетату за присутності еріохрому–чорного Т [5]. Цей метод дозволяє встановити кількісний вміст магнію за катіоном. З літературних джерел відомо, що при взаємодії алоксану з амінокислотами утворюються забарвлені речовини – похідні пурпурової кислоти (мурексид) [3]. З огляду на вищесказане, кількісний вміст магнію аспарагінату можна визначати й за аніонною частиною.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. При взаємодії з алоксаном у середовищі ДМФА магнію аспарагінат дає інтенсивне малинове забарвлення. Оптичну густину забарвленого розчину визначали на спектрофотометрі Specord 200 в ділянці 400–700 нм. Максимум світлопоглинання для забарвленого продукту реакції

перебуває в межах 527 нм. При цій довжині хвилі були розраховані показники чутливості реакції: $\varepsilon=203,18$, $C_{\min}=71$ мкг/мл.

Концентрація, об'єм розчину реагенту та час нагрівання у водяному огрівнику визначались нами за значенням оптичної густини утворених продуктів. Доцільними є використання 0,05 % водного розчину магнію аспарагінату (0,5 мл), 2 % розчину алоксану в ДМФА (2 мл) та нагрівання 5 хв при 65 °С у водяному огрівнику WNB 7-45 з електронним управлінням.

Експериментально було доведено, що додавання солей цинку (1 мл 5 % розчину $Zn(NO_3)_2$) дає кращі результати щодо максимального значення оптичної густини та чутливості реакції. Максимум світлопоглинання за присутності розчину нітрату цинку – при 456 нм, $\varepsilon=384,74$, $C_{\min}=37$ мкг/мл. Забарвлення стійке в часі, й практично не змінюється значення оптичної густини.

Оптимальні умови реакції алоксану з магнієм аспарагінатом вивчали із використанням субстанції, яка відповідала вимогам ДФУ, та поклали в основу методики кількісного визначення готових лікарських форм (таблетки) з їх валідаційною характеристикою.

Розробляючи раціональну методику кількісного аналізу, було визначено межі концентрацій магнію аспарагінату, при яких виконується основний закон світлопоглинання Бугера–Ламберта–Бера.

Точну наважку (0,025 г) субстанції магнію аспарагінату переносили в мірну колбу на 50 мл і розчиняли у воді очищеній, об'єм розчину доводили до мітки. В п'ять мірних колб на 25 мл вносили, відповідно, по 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 мл одержаного розчину. Об'єм доводили водою

© Ю.В. Тимошик, М.М. Васенда, М.М. Михалків, В.В. Петренко, Т.А. Грошовий, 2009.

очищеною до 0,5 мл. У кожен колбу додавали по 1,5 мл ДМФА і 2 мл 2 % розчину алоксану в ДМФА. Реакційну суміш нагрівали у водяному огрівнику 5 хв при 65 °С. Після охолодження додавали 1 мл 5 % розчину нітрату цинку. Забарвлені розчини доводили до мітки ДМФА. Паралельно проводили контрольний дослід, згідно з яким до 0,5 мл води очищеної додавали 1,5 мл ДМФА, 2 мл 2 % розчину алоксану, даний розчин витримували в тих же умовах, що і досліджувані розчини. Оптичну густину розчинів вимірювали за допомогою спектрофотометра при довжині хвилі 456 нм.

Результати, залежність значень оптичної густини від концентрації магнію аспарагіату в кінцевому розчині, а також значення питомого коефіцієнта світлопоглинання наведено у таблиці 1.

Таблиця 1 – Залежність значень оптичної густини та молярного коефіцієнта світлопоглинання від концентрації магнію аспарагіату при $\lambda=456$ нм

№	Концентрація магнію аспарагіату, мг/100 мл розчину	A	$E_{1\%}^{1\text{см}}$
1	0,20	0,1431	715,50
2	0,40	0,2919	729,75
3	0,60	0,4153	692,17
4	0,80	0,5616	702,00
5	1,00	0,7223	722,30

Наступним етапом дослідження був аналіз таблеток магнію аспарагіату з вітаміном В₆, що містили як допоміжні речовини МКЦ 102, натрію кроскармелозу, ПВП, тальк та магнію стеарат. Кількісне визначення магнію аспарагіату в таблетках виконували відповідно до вищеприписаної методики. Паралельно проводили дослід зі стандартним розчином магнію аспарагіату і компенсаційним розчином, який не містив магнію аспарагіату. Проводили перерахунок вмісту аспарагіат-іона на середню масу таблетки.

Результати кількісного визначення магнію аспарагіату в таблетках наведено у таблиці 2.

Таблиця 2 – Кількісний вміст магнію аспарагіату в таблетках

Лікарська форма	Наважка таблеткової маси, г	Вміст магнію аспарагіату в таблетках, %	Вміст аспарагіат-іона згідно з АНД, %
Таблетки "Магнію аспарагіат з вітаміном В ₆ "	0,0144	90,06	85-115
	0,0238	89,92	
	0,0284	88,76	
	0,0302	90,38	
	0,0298	87,78	
	0,0157	95,13	

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Діапазон застосування (range) аналітичної методики. Нами був обраний діапазон застосування від 80 до 120 % згідно з методиками кількісного визначення за ДФУ [2].

Невизначеність аналітичної методики. Розрахунок критеріїв прийнятності методики аналізу: максимально допустимої повної невизначеності – $\max \Delta_{\text{es}} = 1,60$ %, яка пов'язана із симетричними допусками вмісту ± 5 % [7], максимально систематичної похибки – $\max \delta = 0,51$, вкладу плацебо в сумарну величину фонового поглинання 0,0309, критичного значення для остаточного стандартного відхилення – $\text{RSD}_0 \% = \max \Delta_{\text{es}} / t(95, n-2) = 0,84$, індексу кореляції – $R_c = 0,99810$ і практичної невизначеності вільного члена лінійної залежності – $a = 2,6$.

Лінійність. Для визначення лінійності було одержано 3 значення оптичної густини стандартного розчину та 27 значень оптичної густини модельних розчинів. Розраховували відношення середніх значень оптичної густини кожного з 9 розчинів до середнього значення оптичної густини стандартного розчину, одержуючи величини $X_i = C_i / C_{\text{st}} \cdot 100$ % і $Y_i = A_i / A_{\text{st}} \cdot 100$ %. Працювали в нормалізованих координатах, подаючи концентрації та аналітичний сигнал у відсотках до номінальних значень. Визначали також величину $Z_i = 100(Y_i / X_i)$, яка є знайденою концентрацією у відсотках до введеної. Результати статистичного розрахунку лінійної залежності наведено у таблиці 3.

Таблиця 3 – Метрологічні характеристики лінійної залежності

Величина	Значення одержаних величин	Критерії для допуску, число точок 9	Висновок (відповідає чи ні)
b	0,9974	–	–
S _b	0,0015	–	–
a	0,2844	1) $\leq 1,8946 \cdot S_a = 0,2832$; 2) якщо не виконується 1), то $\leq 2,6$	відповідає
S _a	0,1495	–	–
S _r	0,0574	$\leq 0,84$	–
r	0,99992	$\geq 0,99810$	відповідає

Робастність. Для дослідження цього показника був обраний такий параметр, як стійкість досліджуваних розчинів у часі (приготовлених за вищенаведеною методикою). В АНД не регламентується, через який проміжок часу після приготування досліджуваного розчину необхідно проводити дослід, тому ми обрали діапазон часу 2 год. Отримані результати наведено у

Таблиця 4 – Результати вивчення стабільності досліджуваного та стандартного розчинів

№	t, хв, A _i							A _i сер	RSD _t , %	Δ _t , %	maxδ, %
	0	20	40	60	80	100	120				
1	0,6676	0,6667	0,6657	0,6654	0,6651	0,6646	0,6641	0,6656	0,001	0,003	0,51
2	0,6669	0,6657	0,6657	0,6656	0,6649	0,6646	0,6641	0,6654	0,001	0,002	

таблиці 4. Як видно з таблиці 4, $\Delta_t \leq \max \delta = 0,51\%$, отже розчини стабільні протягом 2 год.

Збіжність та правильність досліджуваної методики визначали одночасно. Оптичну гус-

тину всіх 9 розчинів вимірювали при довжині хвилі 456 нм та встановлювали відношення знайденої концентрації до введеної у відсотках (табл. 5).

Таблиця 5 – Результати перевірки правильності та збіжності

№ модельного розчину	Наважка таблеткової маси, мг ($m_{st}=0,0250$)	Введено у % до концентрації розчину порівняння ($X_{i\text{факт}}\%$)	Оптична густина A _i	Знайдено у % до концентрації розчину порівняння ($Y_i\%$)	Знайдено у % до введеного $Z_i=100(Y_i/X_i)$
1	0,0143	80	0,6978	80,19	100,2
2	0,0152	85	0,7398	85,02	100,0
3	0,0160	90	0,7830	89,98	99,98
4	0,0170	95	0,8268	95,01	100,0
5	0,0178	100	0,8702	100,0	100,0
6	0,0188	105	0,9135	104,98	99,98
7	0,0196	110	0,9573	110,01	100,0
8	0,0205	115	1,0007	115,0	100,0
9	0,0214	120	1,0441	120,0	100,0
Середнє Z_i					100,02
Відносне стандартне відхилення $S_{z_i}\%$					0,069
Відносний довірчий інтервал $\Delta_z\% = t(95\%, 8) \cdot S_z = 1,860 \cdot S_z$					0,128
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta\%$					1,60
Систематична похибка $\delta = Z - 100 $					0,020
Критерій невизначеності систематичної похибки $\delta \leq \Delta/3 = 0,128/3 = 0,043$					виконується
Загальний висновок щодо методики					коректна

З таблиці 5 видно, що методика аналізу характеризується достатньою збіжністю та правильністю у всьому діапазоні концентрацій (80-120 %).

Щоб дослідити відтворюваність методики в умовах іншої лабораторії, було проведено вимірювання значень оптичної густини роз-

чинів однієї аналітичної серії на іншому обладнанні, в різні дні, у двох різних лабораторіях, різними аналітиками. Отримані результати порівняння статистичних відхилень двох різних вимірювань, наведені в таблиці 6, свідчать про те, що дана методика може бути коректно відтворена в іншій лабораторії.

Таблиця 6 – Результати дослідження відтворюваності методики

№ розчину	Величина Z_i	
1	99,78	100,01
2	99,51	99,97
3	99,44	99,73
4	99,62	99,81
5	100,02	100,04
Середнє значення		99,91
Об'єднане середнє значення $Z_i\%$		99,79
$S_{\text{intra}}\%$	0,2321	0,1350
$SD_{\text{intra}}\%$	0,1836	
Відносний довірчий інтервал $\Delta_{\text{intra}}\%$		$0,79 \cdot 0,1836 = 0,14 \leq 1,60$

ВИСНОВКИ. 1. Розроблено високочутливу методику кількісного визначення магнію аспарагінату за амінокислотною частиною молекули у таблетках на основі реакції з алоксаном.
2. Оптимізацію умов аналізу здійснено шляхом статистичного планування експерименту.

3. Проведено валідацію методики кількісного визначення магнію аспарагінату відповідно до вимог ДФУ.

4. Встановлено, що методика валідована та відповідає вимогам ДФУ.

ЛІТЕРАТУРА

1. Алексеева О.П. Магний при патологии беременности и родов / О.П. Алексеева, А.В. Клеменев, О.И. Гусева // Рус. мед. журн. – 2004. – № 1. – С. 30-33.

2. Бурчинский С.Г. Магнийсодержащие препараты в современной медицине / С.Г. Бурчинский // Ежедельник аптека. – 2004. – № 40. – С. 8.

3. Васюк С. Спектрофотометричне визначення амоксициліну в лікарських формах / С. Васюк, А. Коржова // Мед. хімія. – 2003. – 5, № 3. – С. 121-125.

4. Верткин А.Л., Гордецкий В.В. / Кардиология. – 1997. – 3, № 11. – С. 96-99.

5. Державна Фармакопея України: Доп. 1. – Х.: PIPEГ, 2004. – С. 85-100.

6. Межевитинова Е.А. Роль магния в развитии предменструального синдрома / Е.А. Межевитинова, В.Н. Прилепская, Н.М. Назарова // Гинекология. – 2003. – № 2. – С. 23-33.

7. Стандартизованная процедура валидации методик количественного анализа лекарственных средств методом стандарта / А.И. Гризодуб, Д.А. Леонтьев, Н.В. Денисенко и др. // Фармаком. – 2004. – № 3. – С. 3-17.

8. Altura V.M. Basic biochemistry and physiology of magnesium: a brief review / V.M. Altura // Magnesium & Trace Elements – 1991. – 10. – P. 8-11.

РАЗРАБОТКА СПОСОБА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ МАГНИЯ АСПАРАГИНАТА В ТАБЛЕТКАХ

Ю.В. Тимошик¹, М.М. Васенда², М.М. Михалкив², В.В. Петренко¹, Т.А. Groshoviy²

ЗАПОРОЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ¹
ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.Я. ГОРБАЧЕВСКОГО²

Резюме

Разработана высокочувствительная методика количественного определения магния аспарагината по аминокислотной части молекулы в таблетках на основании реакции с алоксаном в среде диметилформамида.

Приведена статистически обоснованная процедура валидации, которую осуществляли по схеме согласно ГФУ с рассмотрением таких параметров, как диапазон применения, неопределенность аналитической методики, линейность, робастность, правильность, сходимість.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: статистическое планирование эксперимента, магния аспарагинат, алоксан, спектрофотометрия, количественное определение, валидация аналитической методики.

ELABORATION OF THE WAY AND VALIDATION OF METHOD OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF MAGNIUM ASPARAGINATUM IN TABLETS

Yu.V. Tymoshyk¹, M.M. Vasenda², M.M. Mykhalkiv¹, V.V. Petrenko¹, T.A. Hroshoviy²

ZAPORIZHYAN STATE MEDICAL UNIVERSITY¹
TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY BY I.YA. HORBACHEVSKY²

Summary

Optimal experimental design was made. The method of quantitative spectrophotometric identification of magnesium asparaginat tablets is worked out. This method is based on the interaction preparation reaction with aloxanum. This method is sufficiently sensitive. Statistically motivated procedure of the validation is brought. The validation of the analytical methods was held by the scheme, which is specified in SPU; the following parameters were considered: range of application, specificity, linearity, exactness, accuracy, robustness, convergence of the results.

KEY WORDS: statistical planning of experiment, magnium asparaginat, aloxanum, spectrophotometric method, quantitative determination, validation of the analytical method.

Отримано 10.06.2009 р.

Адреса для листування: Т.А. Groshoviy, Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського, м. Воли, 1, Тернопіль, 46001, Україна.

ВИВЧЕННЯ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ПЛАЗМИ КРОВІ ЩУРІВ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ ГОСТРІЙ НИРКОВІЙ НЕДОСТАТНОСТІ ЗА УМОВ ВПЛИВУ ХРОНІЧНОЇ ГІПОБАРИЧНОЇ ГІПОКСІЇ

С.П. Пасевич

БУКОВИНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ЧЕРНІВЦІ

Вивчено прооксидантно-антиоксидантні властивості плазми крові дорослих білих щурів-самців за вмістом церулоплазміну (ЦП) та малонового діальдегіду (МДА) при гострій нирковій недостатності (ГНН) ("гліцеролова" модель ГНН, відтворена шляхом внутрішньом'язового введення 50 % розчину гліцерину) за умов впливу гіпоксії (модель хронічної гіпобаричної гіпоксії, еквівалентної висоті 4000 м над рівнем моря, тривалістю 2 год щодня впродовж 2 тижнів). Встановлено, що умови хронічної гіпобаричної гіпоксії змінюють перебіг ГНН внаслідок інтенсифікації перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) (за рахунок вірогідного зростання вмісту МДА) при одночасній активації системи антиоксидантного захисту (збільшення вмісту ЦП), що максимально виражено на 48 год розвитку ГНН.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: гостра ниркова недостатність, хронічна гіпобарична гіпоксія, церулоплазмін, малоновий діальдегід.

ВСТУП. В останнє десятиліття не спостерігається істотного прогресу в ефективності лікування ГНН [9], про що свідчить висока летальність, яка складає від 19 до 83 % [10]. Патогенетичні ланки розвитку цієї патології є суперечливими та мінливими, що і визначає неможливість діагностики на ранніх етапах її розвитку та складність у лікуванні [11]. Однак не викликає сумніву те, що порушення стаціонарного стану процесів вільнорадикального окиснення (ВРО) і дисбаланс у бік підсилення ПОЛ є одним з основних чинників у розвитку даної патології [2]. У подальшому пошкодження ниркової тканини внаслідок істотного енергодефіциту [12] викликає гіпоксію ниркового фільтра та запускає каскад функціонально-метаболічних порушень.

Гіпоксія залишається однією із центральних проблем сучасної патології [5], адже, з одного боку, більшість захворювань людини супроводжуються розвитком кисневої недостатності, яка часто визначає тяжкість і прогноз того чи іншого захворювання, проте з іншого – гіпоксична гіпоксія у різних її модифікаціях (інтервальні гіпоксичні тренування, адаптація до умов природного або штучного гірського клімату тощо) останнім часом знаходить усе ширше застосування в клінічній практиці та спортивній медицині [6]. Механізми впливу гіпоксії на організм досліджено недостатньо,

а перебіг гострої ниркової недостатності за умов гіпоксичних станів зовсім не вивчено.

Мета дослідження – з'ясувати стан окремих показників, які характеризують прооксидантно-антиоксидантні властивості плазми крові щурів, при експериментальній гострій нирковій недостатності за умов впливу екзогенної хронічної гіпобаричної гіпоксії.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди проводили на білих лабораторних безпородних статевозрілих щурах-самцях середньою масою 120-180 г. ГНН моделювали шляхом внутрішньом'язового введення 50 % розчину гліцеролу в дозі 8 мг/кг [8], забій тварин здійснювали на 24 та 48 год експерименту з метою з'ясування динаміки змін прооксидантно-антиоксидантної рівноваги плазми крові щурів. Використовували модель хронічної гіпобаричної гіпоксії, яка певною мірою наближена до фізіологічної гіпоксії і включала гіпобаричну гіпоксію в проточній барокамері, створювану шляхом розрідження повітря до величини, що відповідає висоті 4000 м над рівнем моря зі швидкістю "підйому" 0,4 км/хв. На цій висоті щурів утримували впродовж 2 год щоденно 2 тижні. Після останнього сеансу гіпоксії через 30 хв тваринам вводили гліцерин у вказаній дозі.

Щурів забивали шляхом декапітації під легким ефірним наркозом, дотримуючись положення Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, яких використовують в екс-

периментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986).

Стан ПОЛ оцінювали за вмістом МДА в плазмі крові щурів, який визначали за реакцією з тіобарбітуровою кислотою [7], а систему антиоксидантного захисту – за рівнем мідьвмісного антиоксиданта – церулоплазміну, який реєстрували за методом Ревіна [4].

Статистичну обробку отриманих даних проводили за допомогою програми “Excel-7” із використанням t-критерію Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. У результаті проведених досліджень встановлено, що при експериментальній ГНН (“гліцеролова” модель) за умов впливу хронічної гіпобаричної гіпоксії спостерігалось підвищення інтенсивності процесів ПОЛ при одночасній активації системи антиоксидантного захисту плазми крові, що максимально виражено на 48 год розвитку ГНН.

Дослідження процесів ВРО ліпідів і активності антиоксидантної системи є доречним у прогностичному відношенні для встановлення ступеня активності патологічних процесів в організмі [1]. Характер реалізації пошкоджувальної дії ПОЛ в організмі залежить від вторинних стабільних продуктів вільнорадикального окиснення, зокрема МДА, який залишається одним з основних біомаркерів ПОЛ. У ході експерименту показано, що вміст МДА при експериментальній ГНН чітко зростає, причому найбільш виражене його підвищення спостерігалось на 48 год розвитку ГНН, що можна пов'язати із прогресуванням пошкоджувальних впливів оксидативного стресу на нирки та тяжкістю перебігу цієї форми ГНН. Перебіг “гліцеролової” ГНН при дії хронічної гіпоксії вказує на максимально підвищену активацію прооксидантних процесів плазми крові на 48 год розвитку ГНН (вміст МДА збільшувався в 2,6 раза), проте підвищення інтенсифікації цих

процесів чітко простежувалося вже і на 24 год розвитку ГНН (вміст МДА зростає у 2,4 раза). Отже, таке істотне підсилення пошкоджувальної дії вільнорадикальних продуктів спостерігається за рахунок цитотоксичної дії МДА, який утворюється в процесі їх метаболізму. Адже інтенсифікацію процесів ПОЛ, яка відмічається при ГНН, підсилює хронічна гіпоксія, що завжди супроводжується активацією вільнорадикальних процесів та в кінцевому результаті призводить до зміни структури і функції клітинних мембран (табл. 1).

Сироватковою ланкою антиоксидантного захисту організму є ЦП – ферментативний інгібітор ПОЛ, який має багатогранні властивості, у т. ч. проявляє антигіпоксичну дію, що зумовлена активацією ендогенних систем організму. Активність ЦП може відігравати роль прогностичного показника у хворих з патологією нирок [3]. Отримані дані свідчать про максимальну активацію сироваткової ланки антиоксидантного захисту при “гліцероловій” ГНН на 48 год її розвитку. При поєднанні експериментальної ГНН із хронічною гіпоксією рівень ЦП вірогідно зростає в 1,6 раза на 24 год розвитку ГНН та у 2,1 раза на 48 год, що вказує на активацію захисних властивостей ЦП як одного з основних інактиваторів процесів ПОЛ у плазмі крові. У даному випадку (в поєднанні з ГНН) гіпоксичний стимул можна пов'язати не тільки з його пошкоджувальною дією, а й захисною, а саме із включенням фізіологічних та біохімічних механізмів довгострокової адаптації, що дозволяє не лише вижити організму в умовах хронічної нестачі кисню, а й підвищити його стійкість до різноманітних пошкоджувальних чинників (табл. 1).

Отже, згідно з отриманими даними, можна відмітити, що при експериментальній ГНН за умов моделювання хронічної гіпобаричної гіпоксії спостерігається активація ПОЛ у плазмі крові, що вказує на суттєву роль прооксидан

Таблиця 1 – Вміст малонового діальдегіду (мкмоль/л) та церулоплазміну (мг/л) у плазмі крові щурів при експериментальній гострій нирковій недостатності за умов впливу хронічної гіпобаричної гіпоксії ($\bar{x} \pm Sx$, n=7)

Показники	Контроль	ГНН (на 24 год експерименту)	ГНН (на 48 год експерименту)	ГНН (на 24 год експерименту)+гіпоксія (2 тижні)	ГНН (на 48 год експерименту)+гіпоксія (2 тижні)
Вміст МДА у плазмі крові, мкмоль/л	12,7±2,15	18±1,19*	22,7±2,3**,**	30,9±3,35*,**,* ***	32,7±3,12*,**,* ***
Вміст ЦП у плазмі крові, мг/л	135±7,56	166±9,23*,	194,6±9,41*, **	221,7±6,6*, **,* ***	287,4±6,37*, **,* ***

Примітка. * – вірогідність відмінностей порівняно з контролем ($p < 0,05$);

** – вірогідність відмінностей порівняно з ГНН (на 24 год експерименту) ($p < 0,05$);

*** – вірогідність відмінностей порівняно з ГНН (на 48 год експерименту) ($p < 0,05$);

**** – вірогідність відмінностей порівняно з ГНН (на 24 год експерименту)+гіпоксія (2 тижні) ($p < 0,05$).

тних процесів у розвитку цієї патології та на важливість утилізації ендogenous альдегідів за підсиленого радикалоутворення, при істотному підвищенні активності антиоксидантної системи захисту плазми крові.

ВИСНОВКИ. 1. При “гліцероловій” моделі ГНН спостерігається вірогідне підвищення вмісту МДА і ЦП у плазмі крові, що максимально виражено на 48 год розвитку ГНН.

2. При експериментальній ГНН за умов впливу хронічної гіпоксії відмічаються інтенсифікація ПОЛ

за рахунок закономірного підвищення вмісту МДА в плазмі крові та активація системи захисту, на що вказує збільшення вмісту ЦП у плазмі.

3. Хронічна гіпобарична гіпоксія ускладнює перебіг експериментальної ГНН шляхом порушення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги плазми крові за рахунок підсилення вільнорадикального окиснення при одночасній активації сироваткової ланки антиоксидантного захисту вже на 24 год розвитку ГНН, причому на 48 год розвитку ГНН інтенсивність цих змін зростає.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гончарук Є.Г., Коршун М.М. Вільнорадикальне окислення як універсальний неспецифічний механізм пошкоджуючої дії шкідливих чинників довкілля // Журн. АМН України. – 2004. – **10**, № 1. – С. 131-150.

2. Горошко О.М., Заморський І.І. Антиоксидантні властивості препарату “Ліпофлавіон” при експериментальній гострій нирковій недостатності // Мед. хімія. – 2008. – **10**, № 3. – С. 83-86.

3. Ким Л.Б., Калмыкова Е.Ю. Диагностическое и прогностическое значение сывороточного церулоплазмина // Клин. лаб. диагностика. – 2006. – № 5. – С. 13-19.

4. Колб В.Г., Кавышников В.С. Справочник по клинической биохимии. – Минск, 1982. – 311 с.

5. Регада М.С., Любінець Л.А., Бідюк М.М. та ін. Гіпоксія: Довідник. – Львів: Сполом, 2006. – 54 с.

6. Розова К.В. Вплив нормо- та гіпобаричної гіпоксії на ультраструктуру тканин легень і міокарда // Фізіол. журн. – 2008. – **54**, № 2. – С. 63-68.

7. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобар-

битуровой кислоты // Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. – С. 66-68.

8. Chander V., Sigh D., Chopra K. Reversal of Experimental Myoglobinuria Acute Renal Failure in Rats by Quercetin a Bioflavonoid // Pharmacology. – 2004. – **73**, № 1. – P. 49-56.

9. Cheung C.M., Ponnusamy A., Anderton J.G. Management of acute renal failure in the elderly patient: a clinician's guide // Drugs. Aging. – 2008. – **25**, № 6. – P. 55-76.

10. Hoste E.A., Clermont G., Kersten A. et al. RIFLE criteria for acute kidney injury are associated with hospital mortality in critically ill patients: a cohort analysis // Crit. Care. – 2006. – **10**, № 3. – P. 73.

11. Schrier R.W., Wang W., Poole B. et al. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy // J. Clin. Invest. – 2004. – **114**. – P. 5-14.

12. Zager R.A., Johnson A.C., Lund S. Toll-like receptor (TLR4) shedding and depletion: acute proximal tubular cell responses to hypoxic and toxic injury // Am. J. Physiol. Renal. Physiol. – 2007. – **292**, № 1. – P. 304-312.

ИЗУЧЕНИЕ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ ПЛАЗМЫ КРОВИ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ОСТРОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ В УСЛОВИЯХ ВЛИЯНИЯ ХРОНИЧЕСКОЙ ГИПОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ

С.П. Пасевич

БУКОВИНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ЧЕРНОВЦЫ

Резюме

Изучено прооксидантно-антиоксидантные свойства плазмы крови взрослых белых крыс-самцов по сохранению церулоплазмина (ЦП) и малонового диальдегида (МДА) при острой почечной недостаточности (ОПН) (“глицероловая” модель ОПН, которая была воспроизведена путем внутримышечного введения 50 % раствора глицерина) в условиях влияния гипоксии (модель хронической гипобарической гипоксии, эквивалентной высоте 4000 м над уровнем моря, продолжительностью 2 ч ежедневно в течение 2 недель).

Установлено, что условия хронической гипобарической гипоксии изменяют течение ОПН вследствие интенсификации пероксидного окисления липидов (ПОЛ) (за счет достоверного возрастания содержания МДА) при одновременной активации системы антиоксидантной защиты (увеличение содержания ЦП), что максимально выражено на 48 ч развития ОПН.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: острая почечная недостаточность, хроническая гипобарическая гипоксия, церулоплазмин, малоновый диальдегид.

STUDY OF PROOXIDANT-ANTIOXIDANT FEATURES OF RAT BLOOD PLASMA AT EXPERIMENTAL ACUTE RENAL INSUFFICIENCY UNDER THE INFLUENCE OF CHRONIC HYPOBARIC HYPOXIA

S.P. Pasevych

BUCOVYNIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY, CHERNIVTSI

Summary

Prooxidant-antioxidant features of white mature male rats' blood plasma have been studied by ceruplasmin (CP) and malonic aldehyde (MA) content at acute renal insufficiency (ARI) ("glycerol" model of ARI produced by 50 % glycerol solution intramuscular injection) in the conditions of hypoxia influence (chronic hypobaric hypoxia model, equivalent to the altitude of 4000 m with daily duration, for 2 hours in the course of 2 weeks daily). The conditions of chronic hypobaric hypoxia were found to change the course of ARI as the consequence of lipid peroxidation (POL) intensification (at the expense of probable increase of MA content) at the simultaneous activation of antioxidant protection system (CP content increase), which is maximally expressed during at the 48 th hour of ARI development.

KEY WORDS: acute renal insufficiency, chronic hypobaric hypoxia, ceruplasmin, malonic aldehyde.

Отримано 8.04.2009 р.

Адреса для листування: С.П. Пасевич, вул. Міцкевича, 5, кв. 26, Чернівці, 58000, Україна.

СТАН БІЛКОВОГО ОБМІНУ В СТАТЕВОНЕЗРІЛИХ ЩУРІВ ЗА УМОВ ТОКСИЧНОГО УРАЖЕННЯ БЛІДОЮ ПОГАНКОЮ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

І.П. Кузьмак, І.М. Кліщ

ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО

Досліджено деякі показники білкового обміну в статевонезрілих щурів на моделі токсичного ураження токсинами блідої поганки. Встановлено, що отруєння блідою поганкою призводить до порушень обміну білків, що проявляються гіпопротеїнемією, диспротеїнемією за рахунок зменшення вмісту фракції альбумінів та зростання β - і γ -глобулінів. Зниження концентрації сечовини у плазмі крові може бути результатом пригнічення сечовиноутворювальної функції печінки внаслідок інтенсивного розпаду гепатоцитів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: бліда поганка, отруєння, аманітин, фаліоїдин, білковий обмін, щури.

ВСТУП. На сьогодні проблема гострих отруєнь дикорослими токсичними грибами є однією з найактуальніших в токсикології. Актуальність даного феномена в останні роки ще більше зросла, оскільки погіршення економічної ситуації населення спонукає людей збирати дикорослі гриби для урізноманітнення свого харчового раціону, що призводить до масових отруєнь токсичними грибами з високим ступенем летальності, рівень якої досягає 25-35 % [2, 7, 9]. Найнебезпечніші отруєння викликає бліда поганка (БП), яка належить до грибів з гепатотропною дією і містить дуже сильні токсини – аманітини і фаліоїдини, що вибірково впливають на печінкову тканину і проксимальні відділи ниркових каналців, зумовлюють розвиток картини гепатонекрозу і гострої печінково-ниркової недостатності [1, 3, 14].

Основа гепатонекротоксичної дії даних грибів – циклопептиди (ферменти гриба), похідні індолу. Вони атакують насамперед усі фосфодіестерази зв'язки, і молекула РНК розщеплюється на 3 монофосфати. Фаліоїдини діють швидко (через 6-8 год). Вони пошкоджують мембрани ендоплазматичного ретикула, лізосом, пригнічують окисне фосфорилування, синтез глікогену і знижують рівень АТФ-ази. Аманітини діють повільніше (24-48 год), проте їх токсичний ефект в 15-20 разів вищий. Вони впливають на ядерні субстанції, пригнічують утворення РНК, ДНК, в результаті чого розвивається автоліз клітин. Найбільше пошкоджуються клітини з інтенсивним

синтезом білків – гепатоцити, еритроцити, нефроцити і лімфоцити [6, 8].

Відповідно, отруєння БП призводить до гепатотоксичного, нефротоксичного [2, 3], ентоеротоксичного впливів, які зумовлюються порушенням ліпопротеїнових комплексів, збільшенням проникності клітинних мембран з наступним автолізом клітини [3, 7, 13].

Віковий аспект є одним із багатьох важливих чинників, які впливають на розвиток токсичного ефекту в організмі. Біотрансформація отруту у молодому організмі, у зв'язку з високим рівнем обмінних процесів, може призвести до утворення більш токсичних продуктів метаболізму. Тому дія токсичних речовин, яка викликає пошкодження, у молодому організмі більш виражена, ніж у дорослому [10]. У науковій літературі наведено багато інформації щодо механізмів токсичної дії отрути БП на живі істоти, але стосовно вікових особливостей впливу токсинів існує невелика кількість даних.

Враховуючи вищесказане, метою даної роботи стало дослідження деяких біохімічних показників білкового обміну в статевонезрілих щурів при отруєнні токсинами блідої поганки.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проводили на нелінійних статевонезрілих білих щурах-самцях віком 3 місяці й масою 110-150 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію.

Отруєння тварин здійснювали шляхом одноразового внутрішньоочеревинного введення екстракту блідої поганки, отриманого за методом Wieland [15], в дозі 85 мг/кг маси тіла

($1/2 LD_{50}$). Евтаназію щурів проводили шляхом декапітації під тіопенталовим наркозом через 6, 24 та 72 год після отруєння з подальшим вилученням печінки та забором крові. Дослідження виконували згідно з правилами Європейської конвенції про гуманне ставлення до лабораторних тварин [11].

Оцінювали стан білкового обміну за такими показниками: білоутворювальну функцію печінки – за концентрацією загального білка в плазмі крові біуретовим методом і вмістом білкових фракцій сироватки крові методом електрофоретичного розділення на агарозі [4], дезамінування білків у печінці – за активністю аланін- і аспартатамінотрансфераз динітрофенілгідразиним методом (за Райтманом, Френкелем) [12] (за допомогою стандар-

тних наборів ООО НПП “Филисит диагностика”, Україна), детоксикаційну функцію печінки – за концентрацією сечовини (з діацетилмоноксимом) та креатиніну методом Поппера (із застосуванням стандартних наборів ООО НПП “Филисит диагностика”, Україна), концентрацію залишкового азоту – за методом [5].

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з визначенням t-критерію достовірності Стьюдента за допомогою програми Excel.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Дослідження деяких показників білкового обміну у тварин показали, що введення екстракту блідої поганки призводить до суттєвих порушень обміну білків. Результати проведених нами досліджень наведено в таблиці 1.

Таблиця 1 – Вплив токсинів блідої поганки на показники білкового обміну в статевонезрілих щурів ($M \pm m$)

Показник	Біологічна рідина	Інтактні, n=6	Уражені блідою поганкою, n=6			
			6 год	24 год	72 год	
Загальний білок, г/л	Плазма крові	78,85±0,98	73,35±0,89*	51,95±0,89*	50,63±0,77*	
Загальний білок, г/кг	Гомогенат печінки	85,07±1,27	71,2±0,7*	57,75±2,78*	56,38±2,03*	
Альбуміни, %	Плазма крові	55,75±0,51	46,95±0,67*	38,92±1,98*	34,75±1,32*	
Глобуліни, %	α_1 -глобуліни, %	Плазма крові	6,57±0,1	5,97±0,2*	5,05±0,08*	4,68±0,15*
	α_2 -глобуліни, %	Плазма крові	9,72±0,08	8,98±0,09*	8,13±0,15*	7,23±0,05*
	β -глобуліни, %	Плазма крові	12,25±0,26	17,32±0,07*	22,33±0,17*	25,03±0,24*
	γ -глобуліни, %	Плазма крові	15,72±0,2	20,78±0,12*	25,57±0,1*	28,32±0,13*
Альбуміни/глобуліни	Плазма крові	1,26	0,89	0,64	0,53	
Сечовина, ммоль/л	Плазма крові	5,9±0,14	3,7±0,2*	2,92±0,19*	2,57±0,07*	
Креатинін, ммоль/л	Плазма крові	9,55±0,1	11,42±0,13*	13,58±0,13	14,4±0,08*	
Залишковий азот, ммоль/л	Плазма крові	18,2±1,3	27,5±1,1*	28,9±1,5*	29,2±1,4*	
АлАТ, ммоль·год/л	Плазма крові	0,95±0,04	4,83±0,11*	4,35±0,08*	3,53±0,19*	
АлАТ, ммоль·год/кг	Гомогенат печінки	1,34±0,06	1,04±0,08*	1,11±0,04*	1,16±0,04*	
АсАТ, ммоль·год/л	Плазма крові	0,93±0,01	1,93±0,07*	2,48±0,11*	2,75±0,06*	
АсАТ, мкмоль·год/кг	Гомогенат печінки	1,2±0,01	0,94±0,03*	1,07±0,03*	1,1±0,03*	

Примітка. * – різниця достовірна відносно інтактних тварин ($p < 0,05$).

Як відомо, одним із важливих показників стану обміну речовин в організмі тварин є білковий склад крові. Залежно від інтенсивності обміну білків змінюється вміст загального білка та його фракцій у сироватці крові. Альбуміни перш за все є пластичним матеріалом для синтезу білків тканин, ферментів та інших сполук, необхідних для безперервних обмінних процесів в організмі тварин, а гамма-глобулінова фракція сироватки крові містить основну масу імуноглобулінів (антитіл), які забезпечують гуморальний захист організму.

Вміст загального білка в плазмі крові контрольної групи щурів становив (78,85±0,98) г/л. Досліджено, що отруєння токсинами БП призводить до вираженого зменшення концентрації загального білка через 6, 24 та 72 год з моменту введення отрути як у плазмі крові – на 6,98, 34,12 та 35,79 %, так і в гомогенаті печінки – на 16,3, 32,11 та 33,72 % відносно інтактних тварин ($p < 0,05$).

Оскільки печінка є основним місцем синтезу білків, то, природно, при її токсичному ураженні функціональна здатність органа зни-

жується. Вказані зміни свідчать про те, що токсичне ураження організму тварин БП призводить до пригнічення синтезу білків гепатоцитами печінки, що проявляється вираженою гіпопротеїнемією, яка, у свою чергу, зумовлює зменшення загальної опірності організму.

Крім того, при аналізі білкових фракцій (протеїнограми) сироватки крові виявлено певні порушення білкового обміну – диспротеїнемію, яка є характерною ознакою активності патологічного процесу. Як видно з даних таблиці, вміст альбуміну в плазмі крові достовірно знижувався через 6, 24 та 72 год після ураження БП – на 15,78, 30,19 та 37,67 % ($p < 0,05$) відповідно.

Концентрація α_1 - та α_2 -глобулінів також лінійно знижувалась протягом дослідження, причому максимальні її зміни спостерігались через 72 год після інтоксикації і становили, відповідно, на 28,68 та 25,58 % менше від рівня інтактних тварин.

Щодо β - та γ -глобулінів, то їх вміст достовірно підвищувався через 6, 24 та 72 год після ураження БП – в 1,41, 1,82, 2,04 раза (β -глобуліни) та 1,32, 1,63, 1,8 раза (γ -глобуліни) порівняно з контролем ($p < 0,05$).

Той факт, що в уражених тварин вміст γ -глобулінів у крові значно збільшився відносно інтактних (гіпергаммаглобулінемія), свідчить про те, що підвищився синтез імунних білків – імуноглобулінів у відповідь на патологічний процес в організмі, спричинений аманіта-фаллоїдиною інтоксикацією.

Як видно, в уражених щурів відбувається різке зменшення білкового коефіцієнта порівняно з таким у здорових тварин. Вказані зміни свідчать про активну імунологічну реакцію макроорганізму на дію вірусу.

Зміни в білкових фракціях зумовлюють диспротеїнемію, яка виражається так званим білковим коефіцієнтом (відношенням між кількістю альбумінів і сумою глобулінів). Під час проведення досліджень було відмічено, що в уражених тварин відбувається різке зменшення білкового коефіцієнта порівняно з інтактними. Вказані зміни свідчать про активну імунологічну реакцію організму на дію отрути.

Поряд із процесами біосинтезу білків відбуваються і протилежні процеси – їх розпад. Продуктами розпаду білків є такі речовини, як аміак, сечовина, креатин і його похідна – креатинін та інші так звані небілкові азотисті компоненти крові. Азотисті продукти білкового обміну в постійній кількості знаходяться в плазмі крові. В сумі вони складають фракцію залишкового азоту.

Показники залишкового азоту наведено в таблиці 1.

Внаслідок пригнічення синтезу ферментних білків порушується також процес переамінування амінокислот, на що вказує зниження активності амінотрансфераз у печінці. Це може стати причиною накопичення продуктів азотного обміну і зростання концентрації залишкового азоту, що і мало місце у наших дослідженнях.

Сечовина є кінцевим продуктом обміну білків. Під час синтезу сечовини знешкоджується аміак. Концентрація сечовини залежить від інтенсивності її синтезу та виведення. Результати наших досліджень свідчать про достовірне зниження концентрації сечовини в сироватці крові через 6, 24 та 72 год після ураження БП – на 37,29, 50,56 та 56,5 % відповідно (порівняно з контролем), що може бути результатом пригнічення сечовиноутворювальної функції печінки внаслідок інтенсивного розпаду гепатоцитів.

Креатинін є похідною креатину, його кінцевим продуктом метаболізму. Вміст креатиніну в плазмі крові інтактних тварин становив $(9,55 \pm 0,1)$ ммоль/л. Максимальна його концентрація спостерігалась через 72 год після ураження токсинами БП і складала $(14,4 \pm 0,08)$ ммоль/л, що на 50,79 % більше порівняно з інтактними тваринами.

Порушення метаболічних процесів у клітинах печінки призводить до ураження клітинних мембран і цитолізу гепатоцитів, що супроводжується розвитком цитолітичного синдрому та підвищенням рівня трансаміназ крові. Тому важливим критерієм функціонального стану мембранних структур печінки було визначення активності індикаторних ферментів амінотрансфераз – аланін- та аспартатамінотрансфераз (АлАТ та АсАТ) в сироватці крові під впливом отрути БП. Обидва ферменти локалізуються в цитоплазмі клітин, тому при пошкодженні гепатоцитів потрапляють у кров, де їх активність зростає.

Як показали результати досліджень (табл. 1), у крові контрольної групи тварин активність АлАТ становила $(0,95 \pm 0,04)$ мкмоль·год/мл. Введення отрути призвело до зростання активності через 6 год в 5,07 раза, через 24 год – в 4,56 раза та через 72 год – в 3,7 раза ($p < 0,05$ в усіх випадках). З огляду на те, що АлАТ є органоспецифічним ферментом печінки, підвищення його активності в плазмі крові слід розцінювати як наслідок токсичного впливу БП на гепатоцити, що супроводжувався пошкодженням плазматичних мембран.

Дещо нижчу активність, порівняно з АлАТ, мала АсАТ, проте відносно інтактних тварин спостерігалось достовірне зростання показників через 6, 24 та 72 год – у 2,07, 2,66 та 2,95 раза відповідно ($p < 0,05$ в усіх випадках).

На порушення процесу дезамінування за умов дії отрути БП вказують і показники активності АлАТ та АсАТ у гомогенаті печінки здорових та уражених тварин, які наведено в таблиці 1.

ВИСНОВКИ. 1. Отруєння блідою поганкою призводить до виражених порушень білкового обміну в статевонезрілих тварин, що проявляються гіпопротеїнемією, диспротеїнемією

за рахунок зменшення вмісту фракції альбумінів та зростання β - і γ -глобулінів.

2. Зниження концентрації сечовини у плазмі крові може бути результатом пригнічення сечовиноутворювальної функції печінки внаслідок інтенсивного розпаду печінкових клітин.

3. Встановлено вірогідне підвищення у тварин дослідних груп, порівняно з контролем, активності АлАТ й АсАТ, зростання якої у плазмі крові слід розцінювати як наслідок токсичного впливу блідої поганки на гепатоцити, що супроводжувався пошкодженням плазматичних мембран.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бабенко О.В., Авхименко М.М., Агапов В.И. Отравления грибами: вопросы диагностики и лечения // Мед. помощь. – 2002. – № 4. – С. 25-27.

2. Бойчук Б.Р. Інформаційно-пошукова система діагностики отруєнь грибами // Біль, знеболювання і інтенсивна терапія. – 2000. – **1**. – С. 126-127.

3. Бойчук Б.Р. Отруєння грибами (етіологія, патогенез, клініка, диференціальна діагностика, лікування і профілактика). – Тернопіль: Укрмедкнига, 1997. – 200 с.

4. Горячковский А.М. Клиническая биохимия в лабораторной диагностике. – Одесса: Экология, 2005. – 616 с.

5. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. – М.: МЕДпресс – информ., 2004. – 911 с.

6. Курапов Е.П., Минина К.З., Иващенко О.В. и др. Интенсивная терапия отравлений грибами и веществами, содержащимися в них // Біль, знеболювання і інтенсивна терапія. – 2000. – **1**. – С. 109-110.

7. Лужников Е.А., Костомарова Л.Г. Острые отравления: Руководство для врачей. – М.: Медицина, 1989. – 432 с.

8. Малыш И.Р., Макарук В.А., Цепляев В.И. Алгоритмы дифференцированной интенсивной терапии

пациентов с отравлением гепатотропными грибами // Біль, знеболювання і інтенсивна терапія. – 2000. – № 1 (д). – С. 128-130.

9. Митник З.М., Волошинський О.В., Легун О.М. Організація спеціалізованої допомоги при отруєннях грибами // Біль, знеболювання і інтенсивна терапія. – 2000. – **1**. – С. 124-125.

10. Нариси вікової токсикології / За ред. І.М. Трахтенберга. – К.: Авіцена, 2005. – 256 с.

11. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. – Council of Europe. Strasbourg. – 1986. – № 123. – P. 52.

12. Reitman S., Frankel S. A colorimetric method for determination of serum glutamicoxalacetic and glutamicopyruvic transaminases // Amer. J. Clin. Path. – 1957. – **28**. – P. 56.

13. Smith J.F. Mushroom poisoning / http://www.chclibrary.org_2005.

14. Vesconi S., Langer M., Lapichino G. et al. Therapy of cytotoxic mushroom intoxication // Crit. Care Med. – 1985. – **13**, № 5. – P. 402-406.

15. Wieland H., Hallermayer R. Uber die Giftstoffe des Knollenblatterpilzes. VI. Amanitin, das Hauptgift des Knollenblatterpilzes // Liebig's Ann. Chem. – 1941. – Bd. 548. – S. 1-18.

СОСТОЯНИЕ БЕЛКОВОГО ОБМЕНА У НЕПОЛОВОЗРЕЛЫХ КРЫС В УСЛОВИЯХ ТОКСИЧЕСКОГО ПОРАЖЕНИЯ БЛЕДНОЙ ПОГАНКОЙ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

И.П. Кузьмак, И.Н. Клищ
ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ И.Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

Резюме

Исследованы некоторые показатели белкового обмена у неполовозрелых крыс на модели токсического поражения токсинами бледной поганки. Установлено, что отравление бледной поганкой приводит к нарушениям обмена белков, что проявляется гипопропротеинемией, диспротеинемией за счет уменьшения содержания фракции альбуминов и роста β - и γ -глобулинов. Снижение концентрации мочевины в плазме крови может быть результатом угнетения мочевинообразовательной функции печени вследствие интенсивного распада печеночных клеток-гепатоцитов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: бледная поганка, отравление, аманитин, фаллоидин, белковый обмен, крысы.

THE STATE OF PROTEIN METABOLISM IN IMMATURE RATS UNDER CONDITIONS OF TOXIC DAMAGE BY AMANITA PHALLOIDES IN EXPERIMENT

I.P. Kuzmak, I.M. Klishch
TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY BY I.YA. HORBACHEVSKY

Summary

Some parameters of protein metabolism in immature rat on the model of toxic injury by *Amanita phalloides* toxins have been investigated. It has been established that the poisoning by *Amanita phalloides* leads to disturbances in protein metabolism, which manifests itself in hypoproteinemia, dysproteinemia due to reducing the content of albumin fraction and the growth of β - and γ -globulins. Reducing the urea concentration in blood plasma can be the result of oppression of urea-forming liver function due to intensive decay of hepatocytes.

KEY WORDS: *Amanita phalloides*, poisoning, amanitin, phalloidin, protein metabolism, rats.

Отримано 28.09.2009 р.

Адреса для листування: І.П. Кузьмак, Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського, м.Волі, 1, Тернопіль, 46001, Україна.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

ВПЛИВ КОРАРГІНУ НА ЛІПОПЕРОКСИДАЦІЮ РОТОВОЇ РІДИНИ У ПАЦІЄНТІВ З ГЕНЕРАЛІЗОВАНИМ ПАРОДОНТИТОМ

А.В. Юрженко

НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ

Досліджено вплив іммобілізованого на силіксі кораргину на інтенсивність ліпопероксидації в ротовій рідині пацієнтів з генералізованим пародонтитом. Аплікації кораргину нормалізують ліпопероксидацію в ротовій рідині, підсилюють дію антиоксидантної системи, оптимізують лікувальний процес.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: генералізований пародонтит, кораргін, силікс, ліпопероксидація, ротова рідина.

ВСТУП. Серед захворювань пародонта значне місце займає генералізований пародонтит (ГП) – своєрідне дистрофічно-запальне захворювання, яке розвивається внаслідок поєднаного впливу різних екзо- та ендогенних факторів. При ГП у результаті виникнення патологічної рухомості зубів та їх ранньої втрати знижується жувальна ефективність, порушується механічна та ферментативна обробка їжі, що призводить до захворювань шлунково-кишкового тракту. Пародонтальні кишені нерідко є осередками хронічної інфекції, які можуть викликати розвиток ревматоїдних, серцево-судинних та інших захворювань. Біль у пародонті спричиняє рефлекторне порушення функцій слиновиділення, травних залоз, серцево-судинної системи [3, 7].

Експериментальними та клінічними дослідженнями останнього десятиріччя переконливо показано роль хронічної недостатності біоантиоксидантів, яка призводить до посилення процесів вільнорадикального окиснення (ВРО) в тканинах пародонта, до розвитку ГП [1, 2, 10, 14-16]. Для фармакологічної корекції ВРО-зумовленої патології доцільне використання лікарських препаратів – антиоксидантів, які зменшують інтенсивність і виразність реакцій ВРО.

Пошук фізіологічно активних речовин – антиоксидантів з урахуванням їх різноманітних позитивних ефектів, здатних вплинути на складний патогенез запально-дистрофічних захворювань пародонта, є одним з основних завдань сучасної пародонтології, зважаючи на розповсюдження цих захворювань та поєднання зі стійкою тенденцією до зростання їх частоти [3].

Метою дослідження було вивчити вплив кораргину, який іммобілізований на силіксі, на прооксидантно-антиоксидантний гомеостаз у ротовій рідині пацієнтів з ГП.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Антиоксидантно-прооксидантний стан ротової рідини вивчено в осіб віком 18-29 років, хворих на ГП початкового і I-II ступенів.

Першу групу склали 30 осіб з ГП початкового ступеня, другу – 30 осіб з ГП I-II ступенів розвитку. Контролем були 15 практично здорових осіб того ж віку з клінічно здоровими тканинами пародонта. В усіх обстежених проводили комплексне вивчення стану тканин пародонта. Сформовані групи хворих були однорідними та не мали виражених загальносоматичних захворювань.

Матеріалом дослідження у пацієнтів з ГП обрано ротову рідину як одну з найбільш значних альтернатив традиційним у пародонтології біологічним об'єктам – крові та тканинам пародонта. Інтенсивність процесів ліпопероксидації у ротовій рідині оцінювали за накопиченням первинних продуктів ПОЛ – дієнових кон'югатів (ДК) [12], вторинних продуктів ПОЛ – тіобарбітуратактивних речовин, головним з яких є малоновий діальдегід, як при спонтанному неіндукованому ліпоперекисненні (МДА НІ), так і при індукованому аскорбатзалежному процесі в системі Fe(II)–аскорбінова кислота (МДА АЗП) [11]. Ступінь антиоксидантного захисту (АОЗ) оцінювали за активністю супероксиддисмутази (СОД) [13], каталази, вмістом аскорбінової кислоти [8], загальною антиокиснювальною активністю (АОА) ротової рідини [9].

© А.В. Юрженко, 2009.

В роботі використано препарат “Кораргін”, до складу якого входять L-аргінін та інозин (Україна, м. Умань, ЗАТ “Технолог”) і який був іммобілізований на сорбенті силіксі, високодисперсному кремнеземі SiO₂.

Пацієнтам призначали комплексне лікування ГП, яке полягало у видаленні зубних відкладень, усуненні місцевих подразнюючих факторів. Потім їм на ясна робили аплікації пастою кораргіну, який іммобілізований на силіксі. Курс лікування складав 10-12 процедур.

Отримані цифрові дані статистично оброблено методом варіаційної статистики з використанням t-критерію Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Уже після 3-4 сеансів лікування у пацієнтів з ГП зменшувалися набряк, гіперемія, кровоточивість ясен. Результати біохімічних досліджень ротової рідини, які отримано до і після курсу лікування, наведено в таблиці 1. Ці дані вказують на те, що за умов ГП початкового і I-II ступенів у осіб молодого віку відбуваються надмірна активація процесів вільнорадикального окиснення та дискоординація системи АОЗ [6]. Із збільшенням ступеня ГП активність даних процесів зростає, що, ймовірно, пов'язано з гіпоксичними, дистрофічними змінами в тканинах, погіршенням мікроциркуляції в пародонті. При цьому інтенсивність міграції лейкоцитів, можливо, активується за механізмом транссудації залежно від проникності судин при розвитку патологічного процесу в пародонті [4]. Виявлено суттєве збільшення накопичення ДК, МДА, пригнічення загальної АОА. Депресія антиоксидантних ферментів СОД і каталази в ротовій рідині пацієнтів з ГП I-II ступенів вказує на можливе виснаження системи АОЗ. Хоча,

за даними робіт [10], активність каталази в змішаній слині пацієнтів з ГП практично не залежить від ступеня тяжкості захворювання пародонта.

Таким чином, показано, що в патогенезі ГП важлива роль належить активації процесів ВРО, тому доцільним і виправданим є застосування антиоксидантних препаратів, які протидіють оксидативному стресу.

Нами був використаний кораргін, який іммобілізований на ентросорбенті силіксі. Як показано раніше, кораргін має антиоксидантні властивості [5], при цьому силікс проявляє виражену антиексудативну дію, зменшує набряк м'яких тканин пародонта, підвищує антисептичну дію препарату, його адгезивні властивості.

Аплікації кораргіну, який іммобілізований на силіксі, створювали виражений позитивний вплив на стан системи АОЗ, змінювали активність СОД на 25 % в ротовій рідині пацієнтів з ГП початкового ступеня і на 22 % при ГП I-II ступенів, активність каталази підвищилась на 27 та 22 % відповідно.

Кораргін збільшував на 32 % вміст аскорбінової кислоти при ГП початкового ступеня і на 21 % при ГП I-II ступенів. АОА зростала на 31 і 64 % відповідно до тяжкості захворювання в ротовій рідині пацієнтів з ГП. Аскорбінова кислота впливала на утворення колагену і зумовлювала щільність судинної стінки капілярів, зменшувала їх проникність, що особливо важливо на ранніх стадіях ураження пародонта.

Зростання потенційної ємності системи АОЗ під впливом кораргіну забезпечувало зниження інтенсивності ліпідної пероксидації в ротовій рідині пацієнтів з ГП. Накопичення

Таблиця 1 – Рівень ліпопероксидації та активність ферментів антиоксидантної системи у ротовій рідині пацієнтів з генералізованим пародонтитом (M±m)

Досліджений показник	Групи обстежених				
	Контрольна (n=15)	ГП початкового ступеня (n=30)	ГП I-II ступенів (n=30)	ГП початкового ступеня+ кораргін (n=15)	ГП I-II ступенів+ кораргін (n=15)
ДК, ммоль/л	1,32±0,02	1,84±0,03*	2,00±0,08*	1,46± 0,03**	1,56±0,06**
МДА Ні, ммоль/л	2,10±0,57	3,90±0,32*	4,20±0,55*	2,40±0,19**	1,56±0,06**
МДА АЗП, ммоль/л	4,0±0,49	5,30±0,60	6,20±0,43*	3,55±0,42**	4,75±0,38**
СОД, ум. од.	4,12±0,50	5,71±0,43	3,22±0,24	4,35±0,32**	3,92±0,20
Каталаза, ммоль H ₂ O ₂ /л	0,160±0,008	0,120±0,010*	0,090±0,006*	0,152±0,012*	0,110±0,007
Аскорбінова кислота, мг/л	8,70±0,32	6,18±0,30*	5,24±0,43*	8,16±0,26**	6,33±0,24
АОА, %	35,3±2,43	24,4±2,71*	13,7±2,85*	32,3±1,63**	22,5±1,51**

Примітка. * – p<0,05 порівняно з контрольною групою; ** – p<0,05 порівняно з нелікованими пацієнтами.

ДК у хворих на ГП початкового ступеня зменшилось на 20,6 %, при ГП I-II ступенів – на 22 %; накопичення МДА НІ знизилось в ротовій рідині на 38,5 %, МДА АЗП – на 25,7 % у пацієнтів з ГП початкового ступеня; при ГП I-II ступенів інгібування ліпопероксидації відбулося на 33 (МДА НІ) і 23,4 % (МДА АЗП).

ВИСНОВКИ. 1. Біохімічні дослідження показали, що при дистрофічно-запальних про-

цесах в пародонті патогенетично обґрунтованим є застосування антиоксидантної терапії.

2. Під впливом аплікацій кораргину, який іммобілізований на силіксі, відбуваються зниження інтенсивності вільнорадикальних процесів ліпопероксидації, посилення реутилізації АФК, збалансоване підвищення ємності антиоксидантної системи захисту, нормалізація експресії антиоксидантних ферментів, а також реалізація протизапального, в тому числі й антиексудативного, ефекту.

ЛІТЕРАТУРА

1. Белоклицкая Г.В. Возможности антиоксидативной коррекции перекисного окисления липидов при заболеваниях пародонта разной тяжести // Современная стоматология. – 2000. – № 1 (9). – С. 38-41.
2. Бобирев В.М., Скрипникова Т.П. Экспериментальні та клінічні основи застосування антиоксидантів як засобів лікування та профілактики пародонтиту // ДентАрт. – 1995. – № 1. – С. 18-22.
3. Борисенко А.В. Комплексное лечение генерализованного пародонтита // Журн. практ. врача. – 1996. – № 2. – С. 21-23.
4. Гоженко А.І., Бабій С.І., Доломатов С.І. та ін. Стан та механізми формування неспецифічного захисту слизової оболонки порожнини рота у здорових людей // Мед. хімія. – 2002. – 4, № 2. – С. 50-52.
5. Губський Ю.І., Юрженко А.В., Брюзгіна Т.С. та ін. Експериментальні дослідження впливу фламікару та кораргину, які іммобілізовані на силіксі, на ліпопероксидацію в пародонті щурів // Буков. мед. вісник. – 2008. – 12, № 4. – С. 98-100.
6. Губський Ю.І., Юрженко А.В., Задоріна О.В. та ін. Ліпопероксидація ротової рідини у хворих на генералізований пародонтит // Мед. хімія. – 2008. – 10, № 3. – С. 5-9.
7. Данилевский Н.Ф., Борисенко А.В. Заболевания пародонта. – К.: Здоров'я, 2000. – 464 с.
8. Захаров В.В., Николаев А.В., Рашков С.Р. и др. Определение аскорбиновой кислоты в сыворотке крови // Бюл. экспер. биол. и мед. – 1991. – № 3. – С. 324-327.
9. Клебанов Г.Н., Бабенко И.В., Теселкин Ю.О. и др. Оценка антиокислительной активности плаз-

мы крови с применением желточных липопротеинов // Лаб. дело. – 1988. – № 5. – С. 59-60.

10. Пожарицкая М.М., Руднева Б.В., Симакова Т.Г. и др. Использование антиоксиданта коэнзима Q₁₀ в лечении воспалительных заболеваний пародонта // Рос. стомат. журн. – 2004. – № 6. – С. 25-27.

11. Стальная И.Д., Гаришвили Г.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1997. – С. 66-68.

12. Стальная И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных жирных кислот // Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. – С. 63-64.

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

14. Akalin F.A., Baltacioglu E., Alver A. Lipid peroxidation levels and total oxidant status in serum, saliva and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis // J. Clin. Periodontol. – 2007. – 34. – P. 558-565.

15. Canakci V., Yildirim A., Canakci C.F. Total antioxidant capacity and antioxidant enzymes in serum, saliva and gingival crevicular fluid of preeclamptic women with and without periodontal disease // J. Periodontol. – 2007. – 78. – P. 1602-1611.

16. Sobaniec H., Sobaniec W., Sendrowski K. Antioxidant activity of blood serum and saliva in patients with periodontal disease treated due to epilepsy // Advances in Medical Sciences. – 2007. – 52, № 1. – P. 204-206.

ВЛИЯНИЕ КОРАРГИНА НА ЛИПОПЕРОКСИДАЦИЮ РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ У ПАЦИЕНТОВ С ГЕНЕРАЛИЗОВАННЫМ ПАРОДОНТИТОМ

А.В. Юрженко
НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ А.А. БОГОМОЛЬЦА

Резюме

Исследовано влияние иммобилизованного на силиксе кораргина на интенсивность липопероксидации в ротовой жидкости пациентов с генерализованным пародонтитом. Апликации кораргина нормализуют липопероксидацию в ротовой жидкости, усиливают действие антиоксидантной системы, оптимизируют лечебный процесс.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: генерализованный пародонтит, кораргин, силикс, липопероксидация, ротовая жидкость.

EFFECT OF CORARGINE ON LIPID PEROXIDATION OF ORAL LIQUID IN PATIENTS WITH PERIODONTITIS

A.V. Yurzenko
NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY BY O.O. BOHOMOLET'S

Summary

The effect of corargine immobilized on silix on the process of lipid peroxidation in the oral liquid of patients with periodontitis was studied. The applications of corargine immobilized on silix normalize lipid peroxidation in oral liquid, intensificate the action of antioxidant system, optimize treatment of patients with periodontitis.

KEY WORDS: periodontitis, corargine, silix, lipid peroxidation, oral liquid.

Отримано 18.05.2009 р.

Адреса для листування: А.В. Юрженко, вул. Микільсько-Ботанічна, 31, кв. 71, Київ, 01032, Україна.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

ПОКАЗНИКИ УРАЖЕННЯ ПЕЧІНКИ І НИРОК ПРИ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТИ ТА ПРИЗНАЧЕННІ МОДУЛЯТОРІВ СИНТЕЗУ ОКСИДУ АЗОТУ

О.О. Чернухіна

ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО

На моделі стрептозотоцинового цукрового діабету встановлено, що попередник утворення оксиду азоту (NO) глутаргін (L-аргініну-L-глутамат) сприяє зменшенню рівнів глюкози та глікозильованого гемоглобіну, проявів гепато- та нефропатії, одночасно збільшуючи рівень синтезу NO. Інгібітор індукційної NO-синтази аміногуанідин викликає погіршення функціонального стану печінки та нирок при діабеті, на тлі гальмування утворення NO, глюкози та глікозильованого гемоглобіну.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: діабет, стрептозотонин, глутаргін, аміногуанідин, печінка, нирки.

ВСТУП. Існуючі повідомлення про роль системи L-аргінін–оксид азоту на різних стадіях розвитку цукрового діабету та його ускладнень є суперечливими [1, 10, 12, 14, 17]. Результати наших спостережень свідчать про те, що попередник синтезу оксиду азоту (NO) глутаргін (L-аргініну-L-глутамат) при його призначенні тваринам через 2 тижні від початку моделювання стрептозотоцинового (STZ) цукрового діабету сприяє відновленню структури та функції печінки і нирок, що відбувається на тлі активації у них синтезу NO і супроводжується зменшенням рівнів глюкози та глікозильованого гемоглобіну, а блокатор індукційної ізоформи NO-синтази аміногуанідин спричиняє зниження рівнів глюкози та глікозильованого гемоглобіну в крові експериментальних тварин, але не сприяє зворотному розвитку структурно-функціональних змін у печінці та нирках, які розвиваються на тлі діабету [3-7]. Мета дослідження – встановлення особливостей впливу попередника синтезу оксиду азоту глутаргіну та блокатора індукційної ізоформи NO-синтази аміногуанідину на стан печінки і нирок при стрептозотоциновому діабеті при їх введенні від початку моделювання патології.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Цукровий діабет моделювали у 30 білих нелінійних щурів-самців шляхом одноразового інтраперитонеального введення STZ з розрахунку 50 мг/кг маси тіла (контроль – 8 інтактних тварин). Наступного дня 20 щурам, яких поділили на дві групи, починали вводити: 1-й групі – глутаргін

(45 мг/кг) та 2-й – аміногуанідин (10 мг/кг) внутрішньоочеревинно щодня протягом 4 тижнів. Умертвіння тварин здійснювали шляхом декапітації під тіопенталовим наркозом. Біохімічні дослідження проводили через 28 днів від початку моделювання патології. У крові визначали рівні глюкози, глікозильованого гемоглобіну (HbA1C), сечовини, креатиніну, АлАТ, АсАТ, лужної фосфатази, тимолової проби (за стандартними наборами реактивів), активність каталази [2], кількість стабільного метаболіту NO – нітрит-аніона (NO_2^-) [8]. Статистичну обробку результатів досліджень проводили з використанням t-критерію Стьюдента та програми Excel.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. У тварин, яким вводили лише STZ, через 4 тижні експерименту концентрація глюкози і HbA1C у крові зростала, відповідно, у 3,0 та 2,2 рази, що свідчить про розвиток у них цукрового діабету (табл. 1).

Розвиток ураження печінки з проявами цитолізу, холестази та запального компонента при STZ-діабеті (табл. 1) підтверджувався зростанням у крові вмісту АлАТ, АсАТ, лужної фосфатази і тимолової проби (на 33,6; 42,6; 62,4 та 29,0 %). Про порушення видільної функції нирок свідчило збільшення у крові рівнів сечовини та креатиніну (на 46,7 і 10,8 %). Відмічали також підвищення активності каталази (на 48,2 %) та вмісту NO_2^- (на 28,0 %).

Встановлено, що у тварин, які отримували глутаргін (табл. 1), вміст глюкози в сироватці крові та HbA1C зменшувався на 24,5 і 11,0 %, що відбувалось на тлі зростання у крові вмісту NO_2^- (на 18,5 %) та зниження активності каталази (на 34,3 %), причому останній показник у

Таблиця 1 – Зміни біохімічних показників крові щурів при STZ-діабеті та призначенні глутаргіну й аміногуанідину (M±m)

Показник	Група тварин			
	Контроль	STZ-діабет	STZ-діабет+ глутаргін	STZ-діабет+ аміногуанідин
Глюкоза, ммоль/л	5,92±0,17	17,48±0,26 ^{***}	13,19±0,32 ^{***}	14,75±0,31 ^{***}
HbA1C, абс. %	5,83±0,17	12,88±0,45 ^{***}	11,47±0,32 [°]	10,95±0,45 [°]
Каталаза, кат/л	4,29±0,17	6,36±0,21 ^{***}	4,18±0,29 ^{***}	6,10±0,37
NO ₂ ⁻ , мкмоль/л	2,03±0,06	2,60±0,07 ^{***}	3,08±0,08 ^{***}	2,29±0,10 [°]
Креатинін, мкмоль/л	51,00±0,80	56,50±0,73 ^{***}	48,00±1,09 ^{***}	57,50±0,68
Сечовина, ммоль/л	4,57±0,10	6,70±0,28 ^{***}	4,60±0,19 ^{***}	5,42±0,23 [°]
АлАТ, ммоль/(л·год)	0,87±0,05	1,17±0,05 ^{**}	1,00±0,04 [°]	1,28±0,08
АсАТ, ммоль/(л·год)	0,85±0,06	1,21±0,08 ^{**}	1,16±0,02	1,16±0,12
ЛФ, ммоль/л	1,58±0,05	2,57±0,14 ^{***}	1,45±0,03 ^{***}	1,93±0,10 [°]
Тимолова проба, од.д.	1,15±0,02	1,48±0,05 ^{**}	1,12±0,06 ^{***}	1,35±0,07

Примітка. Достовірність відносно контролю (інтактні тварини): [°] – <0,05, ^{**} – <0,02, ^{***} – <0,01, ^{****} – <0,001; відносно STZ-діабету: [°] – <0,05, ^{**} – <0,02, ^{***} – <0,01, ^{****} – <0,001.

цій серії дослідів не відрізнявся від контролю. Повертались до норми також активність АлАТ крові (знижувалась на 14,6 % порівняно з не-лікованими тваринами) (при незмінній, порівняно з патологією, активності АсАТ), лужної фосфатази і тимолова проба (зменшувались на 43,7 та 24,7 %), що підтверджує відновлення функціонального стану печінки, зменшення цитолітичного, холестатичного та запального компонентів її ураження. Про позитивний вплив глутаргіну на стан нирок свідчила нормалізація вмісту креатиніну та сечовини.

Під впливом блокатора іNOS аміногуанідину (табл. 1) вміст глюкози в сироватці крові зменшувався на 15,6 %, HbA1C – на 15,0 %, NO₂⁻ – на 12,0 %. Активність каталази, АлАТ, АсАТ, тимолова проба, вміст креатиніну в цій серії дослідів достовірно не відрізнялись від аналогічних показників у групі контрольної патології. Рівні сечовини та лужної фосфатази знижувались на 19,2 і 24,8 %, але залишались достовірно вищими, ніж у контролі.

Таким чином, призначення попередника синтезу оксиду азоту глутаргіну протягом всього терміну розвитку цукрового діабету та його ускладнень, незважаючи на спричинене ним зростання синтезу оксиду азоту, супроводжується суттєвим покращанням функціонального стану печінки та нирок. Відповідно до даних літератури, позитивний вплив глутаргіну (як аргініновмісного препарату) при діабеті пов'язаний з його здатністю відновлювати функціональний стан системи L-аргінін–NO за рахунок постачання NO-синтази субстратом [9] та ендотелійзалежні судинні функції [16, 18, 20], попереджувати утворення активних форм

кисню і процеси нітрузування білків [11, 15, 16, 19]. Аміногуанідин не призводить до покращання функціонального стану печінки і нирок при цукровому діабеті, проте сприяє зменшенню рівнів глюкози та глікозильованого гемоглобіну. Останнє пояснюється його здатністю гальмувати утворення кінцевих продуктів глікозилювання [13, 15].

ВИСНОВКИ. 1. При стрептозотоциновому цукровому діабеті через 4 тижні від початку розвитку патології відмічають суттєве збільшення рівнів глюкози та глікозильованого гемоглобіну, з'являються ознаки ураження печінки та нирок, що проявляється зростанням у сироватці крові вмісту АлАТ, АсАТ, тимолової проби, лужної фосфатази, сечовини та креатиніну і супроводжується збільшенням вмісту стабільного метаболіту оксиду азоту.

2. Препарат синтезу оксиду азоту глутаргін при його призначенні від початку моделювання цукрового діабету відновлює функціональний стан печінки і нирок, утворення оксиду азоту, що супроводжується зниженням рівнів глюкози та глікозильованого гемоглобіну.

3. Блокатор індукцибельної NO-синтази аміногуанідин при його 4-тижневому введенні за умов експериментального цукрового діабету гальмує синтез оксиду азоту, знижує рівні глюкози та глікозильованого гемоглобіну, але не зменшує ознак ураження печінки і нирок.

4. Отримані результати обґрунтовують перспективу подальшого пошуку і вивчення сполук – модуляторів синтезу оксиду азоту, здатних зменшувати прояви гепато- та нефропатії при цукровому діабеті.

ЛІТЕРАТУРА

1. Ефимов А. Диабетические ангиопатии: этиология и патогенез / А. Ефимов, Н. Зуева, Н. Скребонская // Ліки. – 2004. – № 11 (88). – С. 36-38.
2. Метод определения активности каталазы / [М.А. Королюк, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова и др.] // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16-19.
3. Посохова К.А. Структурно-функціональні зміни у печінці при експериментальному цукровому діабеті й призначенні попередників синтезу оксиду азоту та інгібіторів NO-синтази / К.А. Посохова, О.О. Чернухіна // Фармакологія 2006 – крок у майбутнє : тези допов. III Національного з'їзду фармакологів України, Одеса, 17-20 жовтня 2006 р. – Одеса, 2006. – С. 139.
4. Чернухіна О.О. Морфологічні зміни у нирках при експериментальному цукровому діабеті та призначенні блокаторів NO-синтаз / О.О. Чернухіна, К.А. Посохова, Т.В. Дацко // Здобутки клінічної і експериментальної медицини : збірник матеріалів конф., Тернопіль, 4 червня 2009 р. – Тернопіль, 2009. – С. 150.
5. Чернухіна О.О. Морфологічні зміни у печінці при експериментальному діабеті та призначенні попередників та блокаторів синтезу оксиду азоту / О.О. Чернухіна, К.А. Посохова, Т.В. Дацко // Вісник морфології. – 2009. – **15**, № 1. – С. 18-21.
6. Чернухіна О.О. Фармакологічна корекція системи L-аргінін-оксид азоту і стан печінки при цукровому діабеті / О.О. Чернухіна // Мед. хімія. – 2007. – № 4. – С. 47-50.
7. Швед М.І. Вплив глутаргіну та аміногуанідину на стан нирок при експериментальному цукровому діабеті / М.І. Швед, К.А. Посохова, О.О. Казанська // Здобутки клінічної і експериментальної медицини : матеріали XLVIII підс. наук.-практ. конф. – Тернопіль, 2005. – С. 215-217.
8. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids / [L.C. Green, A.W. David, J. Glogovski et al.] // *Analyt. Biochem.* – 1982. – **126**, №1. – P. 131-138.
9. Boger R.H. Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, explains the "L-arginine paradox" and acts as a novel cardiovascular risk factor / R.H. Boger // *J. Nutr.* – 2004. – **134**, № 10. – P. 2842S-2847S.
10. Can nitric oxide-generating compounds improve the oxidative stress response in experimentally diabetic rats? / [A.M. Mohamadin, L.N. Hammad, M.F. El-Bab, H.S. Gawad] // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* – 2007. – **34**, № 7. – P. 586-593.
11. Cardounel A.J. Endogenous methylarginines modulate superoxide as well as nitric oxide generation from neuronal nitric-oxide synthase: differences in the effects of monomethyl- and dimethylarginines in the presence and absence of tetrahydrobiopterin / A.J. Cardounel, Y. Xia, J.L. Zweier // *J. Biol. Chem.* – 2005. – **280**, № 9. – P. 7540-7549.
12. Endothelial nitric oxide in diabetes mellitus: too much or not enough? / [K. Farkas, B. Sarman, G. Jermendy, A. Somogyi] // *Diabetes Nutr. Metab.* – 2000. – **13**, № 5. – P. 287-297.
13. Gugliucci A. A practical method to study functional impairment of proteins by glycation and effects of inhibitors using current coagulation/fibrinolysis reagent kits / A. Gugliucci // *Clin Biochem.* – 2003. – **36** (2). – P. 155-158.
14. Haluzik M. The role of nitric oxide in the development of streptozotocin-induced diabetes mellitus: experimental and clinical implications / M. Haluzik, J. Nedvidkova // *Physiol. Res.* – 2000. – **49**, № 1. – P. 37-42.
15. High glucose-induced tyrosine nitration in endothelial cells: role of eNOS uncoupling and aldose reductase activation / [A.B. El-Remessy, G. Abou-Mohamed, R.W. Caldwell et al.] // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2003. – **44**, № 7. – P. 3135-3143.
16. Kabat A. L-arginine supplementation prevents the development of endothelial dysfunction in hyperglycaemia / A. Kabat, S. Dhein // *Pharmacology.* – 2006. – **76**, № 4. – P. 185-191.
17. Komers R. Paradoxes of nitric oxide in the diabetic kidney / R. Komers, Sh. Anderson // *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* – 2003. – **284**, № 6. – P. 1121-1137.
18. Role of oxidative stress in development of cardiovascular complications in diabetes mellitus / [M.A. Haidara, H.Z. Yassin, M. Rated et al.] // *Curr. Vasc.* – 2006. – **4**, № 3. – P. 215-227.
19. Role of renal nitric oxide synthase in diabetic kidney disease during the chronic phase of diabetes / [M. Khamaisi, S. Keynan, M. Bursztyn et al.] // *Nephron Physion.* – 2006. – **102**, № 3-4. – P. 72-80.
20. Study on the altered nitric oxide metabolism in experimental diabetes / [T. Tabi, Z. Soltesz, K. Magyar, E. Szoko] // *Acta Pharm. Hung.* – 2006. – **76**, № 1. – P. 19-23.

ПОКАЗАТЕЛИ ПОРАЖЕНИЯ ПЕЧЕНИ И ПОЧЕК ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ И НАЗНАЧЕНИИ МОДУЛЯТОРОВ СИНТЕЗА ОКСИДА АЗОТА

Е.А. Чернухина

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

Резюме

На модели стрептозотоцинового сахарного диабета установлено, что прекурсор синтеза оксида азота (NO) глутаргин (L-аргинина-L-глутамат) способствует уменьшению уровней глюкозы и гликозилированного гемоглобина, проявлений гепато- и нефропатии, одновременно увеличивая уровень синтеза NO. Ингибитор индуцибельной NO-синтазы аминоганидин вызывает ухудшение функционального состояния печени и почек при диабете, на фоне торможения образования NO, глюкозы и гликозилированного гемоглобина.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: диабет, стрептозоточин, глутаргин, аминоганидин, печень, почки.

SIGNS OF LIVER AND KIDNEY DAMAGE IN DIABETES MELLITUS AND ADMINISTRATION OF NITRIC OXIDE SYNTHESIS MODULATORS

O.O. Chernukhina

TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY BY I.YA. HORBACHEVSKY

Summary

It was proved on streptozotocin model of diabetes mellitus that precursor of nitric oxide (NO) synthesis glutargine (L-arginine-L-glutamate) reduces the levels of glucose and glycated hemoglobin in blood, signs of hepato- and nephropathy with simultaneous increase of nitric oxide synthesis. Inducible NO-synthase inhibitor aminoguanidine causes progression of liver and kidney damage and decrease of NO, glucose and glycated hemoglobin formation.

KEY WORDS: diabetes, streptozotocin, glutargine, aminoguanidine, liver, kidneys.

Отримано 26.10.2009 р.

Адреса для листування: О.О. Чернухіна, Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського, м. Воли, 1, Тернопіль, 46001, Україна.

ОБГРУНТУВАННЯ ЗАСТОСУВАННЯ ІНДУКТОРА ЕНДОГЕННОГО ІНТЕРФЕРОНОУТВОРЕННЯ У ХВОРИХ НА ОСТЕОАРТРОЗ У ПОЄДНАННІ З ХРОНІЧНИМИ ОБСТРУКТИВНИМИ ЗАХВОРЮВАННЯМИ ЛЕГЕНЬ

С.М. Андрейчин, І.І. Ганьбергер

ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО

Вивчали клініко-імунологічні особливості остеоартрозу (ОА) в поєднанні з хронічним обструктивним захворюванням легень (ХОЗЛ) у 16 хворих віком від 29 до 84 років та ОА без супутньої патології у 48 хворих віком від 28 до 79 років. У пацієнтів із поєднаною патологією ОА клінічно перебігав тяжче. Вміст фактора некрозу пухлин α і С-реактивного білка у сироватці крові був статистично достовірно вищим у хворих з мікст-патологією. Встановлено доцільність призначення індуктора ендогенного інтерфероноутворення (Аміксин ІС виробництва "ІнтерХім", Україна) пацієнтам з комбінованою патологією.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: остеоартроз, хронічне обструктивне захворювання легень, фактор некрозу пухлин α , С-реактивний білок, аміксин.

ВСТУП. Остеоартроз (ОА) займає провідне місце в структурі ревматичних захворювань і становить 40-50 %. [3-5, 11].

Хронічне обструктивне захворювання легень (ХОЗЛ) об'єднує групу хронічних хвороб органів дихання, спільною ознакою яких є повільнопрогресуюча незворотна бронхіальна обструкція, що призводить до порушення прохідності дихальних шляхів [14].

У клінічній практиці спостерігається поєднання обох захворювань.

У патогенезі ОА важлива роль належить імунному компоненту, що проявляється реакціями клітинного і гуморального типів, циркуляцією антитіл до хрящової тканини. Це призводить до змін у синовіальній рідині та, як наслідок, посилення дегенеративних процесів. У руйнуванні хрящової тканини беруть також участь прозапальні цитокіни, основними з яких є інтерлейкін І і фактор некрозу пухлин α (ФНП- α). Свою деструктивну роль вони відіграють через активацію протеолітичних ферментів (металопротеїназ). ФНП- α пригнічує синтез протеогліканів і колагену, індукує утворення простагландинів, оксиду азоту, який має пряму цитотоксичну дію на хондроцити [3-5, 7, 11].

При ХОЗЛ на різних етапах патологічного процесу наявний імунологічний дисбаланс [9]. Інфекційні агенти, серед яких близько 20-30 % пневмотропних вірусів, є обов'язковим складником патогенезу ХОЗЛ і навіть у стадії ремісії

сприяють прогресуванню хвороби [9]. Патологічний процес не обмежується лише місцевими змінами в бронхолегеневій системі, на позалегеновому рівні він набуває системних проявів у вигляді оксидативного стресу, зростання у крові рівня циркулюючих прозапальних цитокінів, тканинної гіпоксії [6].

Зважаючи на все вищесказане, доцільним є застосування засобу, який би відновив баланс важливих елементів імунної системи, позитивно впливав на імунну систему, мав протівірусну активність. Одним із таких препаратів є індуктор ендогенного інтерфероноутворення – Аміксин ІС ("ІнтерХім", Україна), який пройшов апробацію у провідних клініках Москви, Санкт-Петербурга, Одеси [2].

При огляді наукової літератури ми не знайшли робіт щодо дослідження імунологічних змін при ОА на тлі ХОЗЛ і проведення їх корекції. Тому метою нашої роботи стало вивчення клінічних та імунологічних змін у такої категорії хворих; дослідження ефективності застосування аміксину.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Було проведено клінічне та імунологічне обстеження 64 пацієнтів з ОА (21 чоловіка та 43 жінок). У 16 осіб (4 чоловіків і 12 жінок) віком від 29 до 84 років діагностовано ХОЗЛ І-ІІ ступенів. Групу порівняння склали 48 хворих лише з ОА (17 чоловіків, 31 жінка) віком від 28 до 79 років. Дослідження проводили на базі загальнотерапевтичного і ревматологічного відділень

© С.М. Андрейчин, І.І. Ганьбергер, 2009.

Тернопільської міської клінічної лікарні № 2. Контрольну групу склали 20 здорових людей. В обстеження не включали осіб із супутніми ендокринологічними захворюваннями, хірургічною постменопаузою, підозрою на реактивний артрит, індексом маси тіла, більшим 25 кг/м², та III рентгенологічною стадією ОА за Н.С. Косинською. ОА діагностували на основі уніфікованих діагностичних критеріїв, розроблених Американською колегією ревматологів і схвалених Асоціацією ревматологів України [4, 5]. Діагноз ХОЗЛ верифікували на основі клінічної картини та інструментальних (дослідження функції зовнішнього дихання, рентгенографія органів грудної порожнини) даних згідно з наказом МОЗ України від 19.03.2007 р. № 128 [12]. Тяжкість суглобового синдрому оцінювали за такими показниками, як: суглобовий індекс (СІ), альгофункціональний індекс Ле-

кена (АІЛ), біль за візуально-аналоговою шкалою (ВАШ) Хаскіссона [11].

Імунологічне дослідження включало визначення в сироватці крові С-реактивного протеїну (СРП) ("DAI", США) та ФНП-α ("ProCon", Росія) на фотометрі – аналізаторі імуноферментному "Sunrise" (Австрія).

Статистичну обробку результатів проводили, застосовуючи електронні таблиці Excel 2003 for Windows (Microsoft, USA), з визначенням критерію Стюдента (t) і статистичної достовірності (p). Результат вважали достовірним при значеннях p<0,05.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. У хворих, в яких ОА перебігав на фоні ХОЗЛ, відмічено зростання СІ (p<0,01), інтенсивності болю за ВАШ (p<0,001). При цьому між показниками АІЛ достовірної різниці не виявили (p>0,05) (табл. 1).

Таблиця 1 – Клініко-функціональні індекси у хворих на ОА й ОА в поєднанні з ХОЗЛ (M±m)

Показник	1-ша група (n=48)	2-га група (n=16)	p
СІ, бали	1,39±0,11	1,88±0,13	<0,01
АІЛ, бали	9,23±0,22	9,56±0,26	>0,05
Інтенсивність болю за ВАШ, см	5,54±0,16	7,94±0,47	<0,001

Аналіз виявив у сироватці крові пацієнтів з мікст-патологією вищі рівні С-РБ, які були в 6,1 раза більшими (p<0,001) за показники здорових осіб та тільки в 1,3 раза більшими (p<0,05) порівняно з хворими на ОА без супутнього ХОЗЛ (табл. 2).

Концентрація ФНП-α у хворих 2-ї групи була вищою у 2,7 раза (p<0,001) проти здорових осіб і в 1,4 раза (p<0,05) проти пацієнтів 1-ї групи (табл. 2).

Таким чином, у хворих на ОА в поєднанні з ХОЗЛ виявлено значні зміни імунологічних показників, що вказують на запальний процес.

Пацієнтів 2-ї групи ми поділили на дві підгрупи. Першу підгрупу склали 8 осіб (1 особа з ХОЗЛ I ст., 7 осіб з ХОЗЛ II ст.), які одержували лише базисну терапію ОА (протизапальні й знеболювальні препарати, хондропротектори, препарати, що поліпшують мікроциркуляцію). Пацієнти другої підгрупи, аналогічної за

складом, крім базисної терапії, отримували Аміксин ІС згідно з інструкцією (таблетки 0,125 г, по 1 таблетці 1 раз на день 2 дні, а згодом через 48 год – впродовж 5 тижнів).

Слід зазначити, що в обох підгрупах обстежених зменшилися СІ (p<0,05 і p<0,001), АІЛ (p<0,001 і p<0,001), ВАШ (p<0,001 і p<0,001), рівень С-РБ (p>0,05 і p<0,001), ФНП-α (p<0,01 і p<0,001) (табл. 3).

Як свідчать дані таблиці 3, СІ знизився у першій підгрупі в 1,9 раза (p<0,05), а у другій – в 4,9 раза (p<0,001). АІЛ зменшився в 1,6 (p<0,001) і 2,1 раза (p<0,001) відповідно. Інтенсивність болю за ВАШ знизилась, відповідно, в 1,6 (p<0,001) та 2 рази (p<0,001). Рівень С-РБ зменшився в першій підгрупі в 1,7 раза, але статистично не відрізнявся від вихідного (p>0,05), у другій – в 3,3 раза (p<0,001). ФНП-α в першій підгрупі знизився у 2 рази (p<0,01), а в другій – у 2,8 раза (p<0,001).

Таблиця 2 – Імунологічні зміни у хворих на ОА й ОА в поєднанні з ХОЗЛ (M±m)

Показник	1-ша група (n=48)	2-га група (n=16)	p	Здорові люди (n=20)
С-РБ, мг/л	4,77±0,36***	6,26±0,61***	<0,05	1,02±0,10
ФНП-α, нг/л	112,90±12,87***	158,09±13,17***	<0,05	41,95±2,16

Примітка. *** – p<0,001 між показниками здорових осіб і хворих.

Таблиця 3 – Динаміка клініко-функціональних та імунологічних показників під впливом лікування (M±m)

Показник	Перша підгрупа (n=8)	Друга підгрупа (n=8)	p
СІ, бали	1,88±0,23	1,88±0,13	>0,05
	1,00±0,19	0,38±0,18	<0,05
	<0,05	<0,001	
АІЛ, бали	9,63±0,38	9,50±0,38	>0,05
	6,13±0,30	4,63±0,26	<0,01
	<0,001	<0,001	
Інтенсивність болю за ВАШ, см	6,38±0,32	7,00±0,53	>0,05
	3,88±0,40	3,50±0,27	>0,05
	<0,001	<0,001	
С-РБ, мг/л	6,11±0,94	6,41±0,85	>0,05
	3,66±0,67	1,93±0,45	<0,05
	>0,05	<0,001	
ФНП-α, нг/л	149,78±18,64	166,41±19,38	>0,05
	74,87±10,50	59,54±5,64	>0,05
	<0,01	<0,001	

На сьогодні немає даних про те, як саме впливає рівень С-РБ і ФНП-α на перебіг досліджуваної комбінованої патології. С-РБ – α₂-глобулін, який синтезується в гепатоцитах, є раннім неспецифічним, проте дуже чутливим маркером ушкодження тканин і запалення [1, 8, 13, 15].

ФНП-α – поліпептидний цитокін, який є основним медіатором запалення. У крові хворих на ХОЗЛ дослідники [9] відмічають варіабельність його рівня. Для ОА характерне підвищення цього цитокіну в сироватці хворих [7, 8, 13].

Високі рівні С-РБ і ФНП-α у пацієнтів з комбінованою патологією вказують на важливу роль імунологічного компонента в патогенезі захворювання.

Характерне для ХОЗЛ персистуюче системне запалення, очевидно, робить вагомий

внесок у патогенез ОА, спричиняючи посилення деструктивних процесів у суглобових структурах.

ВИСНОВКИ. 1. У хворих з поєднаною патологією ОА мав тяжкий клінічний перебіг, що проявлялося вираженим зростанням СІ, інтенсивності болю за ВАШ.

2. Рівні ФНП-α і С-РБ є вищими у хворих на ОА в поєднанні з ХОЗЛ проти хворих на ОА без супутньої патології.

3. Індуктор ендogenousного інтерферонуутворення Аміксин ІС сприяє зменшенню проявів суглобового синдрому і зниженню сироваткового рівня С-РБ і ФНП-α у хворих на ОА в поєднанні з ХОЗЛ.

4. Індуктор ендogenousного інтерферонуутворення Аміксин ІС доцільно використовувати у комплексному лікуванні пацієнтів з ОА на тлі ХОЗЛ.

ЛІТЕРАТУРА

1. Авдеев С.Н. С-реактивный белок – новый или старый маркер бронхолегочных инфекций? // Атмосфера. Пульмонология и аллергология. – 2008. – № 4. – С. 26-32.
2. Амиксин. Возможности и перспективы применения в клинической практике: Информ.-анал. сб. – М., 2001. – С. 5.
3. Гужевский И.И. Современные представления о патогенезе, диагностике и медикаментозном лечении первичного остеоартроза суставов нижних конечностей // Журнал практического врача. – 2005. – № 6. – С. 5-1.
4. Дядик А.І., Шпилева Н.І., Здиховська І.І. та ін. Сучасні підходи до лікування та діагностики остеоартрозу: Методичні рекомендації. – К.: СПД Шкода Ю.В., 2005. – 32 с.

5. Коваленко В.Н., Борткевич О.П. Остеоартроз: Практическое руководство. – К.: Морион, 2003. – 448 с.

6. Комлев А.Д., Калинина Н.М., Сысоев К.А. и др. Цитокиновый профиль у больных хронической обструктивной болезнью легких // Медицинская иммунология. – 2002. – 4, № 1. – С. 87-92.

7. Королев А., Цурко В. Роль цитокинов в развитии остеоартроза // Врач. – 2000. – № 1. – С. 58-61.

8. Мхітарян Л.С., Гавриленко Г.І., Проценко Г.О., Борткевич О.П. Клінічні показники, біохімічні та імунологічні зміни у хворих на остеоартроз колінних суглобів: можливості корекції на основі глюкозаміну гідрохлориду // Укр. ревматол. журн. – 2005. – 3, № 21. – С. 29-35.

9. Перцева Т.О., Конопкіна Л.І. Роль системних маркерів запалення у формуванні імунологічної

відповіді на інфекцію/колонізацію у хворих на хронічне обструктивне захворювання легень // Укр. пульмонолог. журн. – 2007. – № 1. – С. 22-26.

10. Поворознюк В.В. Захворювання кістково-м'язової системи в людей різного віку: У 2-х т. – К., 2004. – Т. 1. – 478 с.

11. Практичні навички в ревматології: Навчальний посібник / За ред. В.М. Коваленка, Н.М. Шуби. – К.: Моріон, 2008. – 256 с.

12. Про затвердження клінічних протоколів надання медичної допомоги за спеціальністю "Пульмонологія": Наказ від 19.03.2007 № 128.

13. Проценко Г.О. Результати тривалого застоювання хондропротекторів у лікуванні хворих на остеоартроз колінних суглобів // Буковинський медичний вісник. – 2008. – **12**, № 4. – С. 26-31.

14. Фещенко Ю. Хронічні обструктивні захворювання легень: проблемні питання // Нова медицина. – 2005. – **18**, № 1. – С. 18-20.

15. Stockley R.A. Biomarkers in COPD: time for deep breath // Thorax. – 2007. – **62**, № 8. – P. 657-660.

ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ ИНДУКТОРА ЭНДОГЕННОГО ИНТЕРФЕРОНООБРАЗОВАНИЯ У БОЛЬНЫХ ОСТЕОАРТРОЗОМ В СОЧЕТАНИИ С ХРОНИЧЕСКИМИ ОБСТРУКТИВНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЛЁГКИХ

С.М. Андрейчин, И.И. Ганьбергер

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

Резюме

Изучали клинико-иммунологические особенности остеоартроза (ОА) в сочетании с хроническим обструктивным заболеванием лёгких (ХОЗЛ) в 16 больных в возрасте от 29 до 84 лет и ОА без сопутствующей патологии в 48 больных в возрасте от 28 до 79 лет. У пациентов с комбинированной патологией ОА клинически проявлялся тяжелее. Содержание фактора некроза опухолей α и С-реактивного белка в сыворотке крови было статистически достоверно выше у больных с микст-патологией. Установлена целесообразность назначения индуктора эндогенного интерферонообразования (Амиксин IC производства "ИнтерХим", Украина) пациентам с комбинированной патологией.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: остеоартроз, хроническое обструктивное заболевание легких, фактор некроза опухолей α , С-реактивный белок, амиксин.

BACKGROUNDS OF ENDOGENOUS INTERFERON INDUCTOR APPLICATION FOR PATIENTS WITH OSTEOARTHRITIS IN COMBINATION WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

S.M. Andreychyn, I.I. Hanberher

TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY BY I. YA. HORBACHEVSKY

Summary

Clinical and immunologic features of osteoarthritis (OA) in combination with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) were studied in 16 patients aged from 29 to 84 and 48 patients with OA without concomitant pathology aged from 28 to 79. The course of OA was more severe if the disease was combined with other pathology. Contents of tumour necrosis factor α (TNF- α) and C-reactive protein (C-RP) in patients' blood was statistically certainly higher in combined pathology. Expedience of application of endogenous interferon inductor (Amixin IC "InterChim", Ukraine) was proved in treatment of patients with combined pathology.

KEY WORDS: osteoarthritis, chronic obstructive pulmonary disease, tumor necrosis factor α , C-reactive protein, Amixin IC.

Отримано 21.10.2009 р.

Адреса для листування: І.І. Ганьбергер, Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського, м. Воли, 1, Тернопіль, 46001, Україна.

ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК МІЖ ГРУПАМИ КРОВІ АВ0 ТА БІЛКОВИМ СКЛАДОМ ЇЇ КРОВІ В ОНКОЛОГІЧНИХ ХВОРИХ

І.Б. Чень

ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ ПЕДАГОГІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ В. ГНАТЮКА

Вивчено групи крові системи АВ0 і білковий склад крові у практично здорових осіб та онкологічних хворих. Виявлено, що серед хворих частіше трапляються особи з А(II) групою крові. Встановлено кількісний перерозподіл окремих фракцій білків крові в онкохворих. У хворих з А(II) групою крові ці зміни були найбільш суттєвими.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: групи крові, білки крові, онкологічні хворі.

ВСТУП. Аналіз літературних даних про значення груп крові у визначенні й розвитку ракових захворювань показав, що між групами крові системи АВ0 та схильністю до онкологічних захворювань існує зв'язок [7, 8]. Зокрема, розвитку онкологічних захворювань в осіб з А(II) групою крові може сприяти відносний дефіцит інтерферону, який забезпечує протівірусний і протипухлинний захист організму, оскільки виявлено, що серед носіїв з А(II) групою слабші продуценти інтерферону зустрічаються частіше, ніж серед людей з іншими групами крові [1]. Відомо також, що зміни білкового спектра крові при злоякісних новоутвореннях характеризуються різким зниженням вмісту альбуміну і значним збільшенням рівня всіх глобулінових фракцій (внаслідок їх гіперпродукції у відповідь на викликане синдромом інтоксикації пригнічення біосинтезу альбуміну в печінці) [3]. При злоякісних новоутвореннях внутрішніх органів більшість авторів вважає закономірним зростання α_2 -, γ -, меншою мірою – α_1 -глобулінів. Різні результати отримано лише щодо змін β -глобулінів [4]. Водночас відсутні публікації стосовно особливостей білкових змін крові залежно від групи крові хворих.

Тому метою роботи було дослідити зв'язок онкологічних захворювань з групами крові системи АВ0 у поєднанні з вивченням білкового спектра сироватки крові.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Для вивчення розподілу груп крові проаналізовано 978 історій хвороб пацієнтів, які перебували на лікуванні в Тернопільському обласному онко-

логічному диспансері протягом 2000-2003 рр. Контролем слугували 1804 практично здорових людини м. Тернополя та області (аналізували індивідуальні медичні картки).

Дослідженню білків крові підлягали вперше виявлені хворі віком від 26 до 84 років, які у 2005 р. перебували на стаціонарному лікуванні в Тернопільському обласному онкологічному диспансері. До контрольної групи ввійшли практично здорові особи (донори міської станції переливання крові).

Групи крові системи АВ0 визначали за допомогою стандартних сироваток методом аглютинації [2]. З метою дослідження білків крові використовували "Діагностичний набір для електрофоретичного розділення білків сироватки на агарозі Cormay gel protein 100" виробництва фірми "Cormay" (Австрія) [5]. Кількісну обробку електрофореграм проводили на денситометрі. Отримані дані обробляли за допомогою математично-статистичних методів. Варіаційний аналіз здійснювали із застосуванням t-критерію Стьюдента [6].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Дані про розподіл груп крові системи АВ0 у практично здорових осіб та онкологічних хворих відображено на рисунку 1. Серед хворих, порівняно зі здоровими, більше осіб з 0(I) і А(II) групами крові (на 2,8 і 3,5 % відповідно). Тому можна припустити, що більшу схильність до онкозахворювань мають люди з А(II) групою крові.

Отримані середні показники фракційного складу білків сироватки у людей із злоякісними новоутвореннями, порівняно зі здоровими, показали зменшення фракції альбуміну

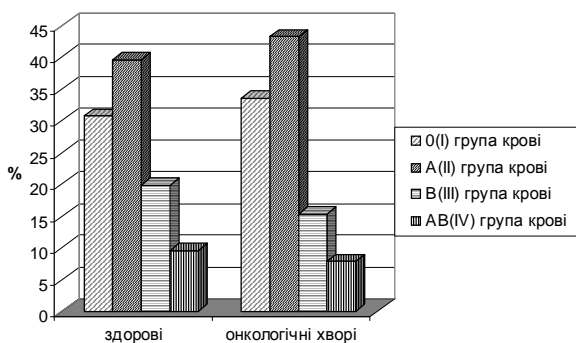


Рис. 1. Розподіл груп крові системи АВО у практично здорових осіб та онкологічних хворих.

(53,87 проти 62,27 %) при одночасному збільшенні α_2 - (8,99 проти 7,03 %), β - (11,64 проти 10,27 %) і γ -глобулінів (21,71 проти 15,96 %). При цьому відмінності між показниками альбумінів, α_2 - і γ -глобулінів виявилися вірогідними ($p \leq 0,05$) (рис. 2).

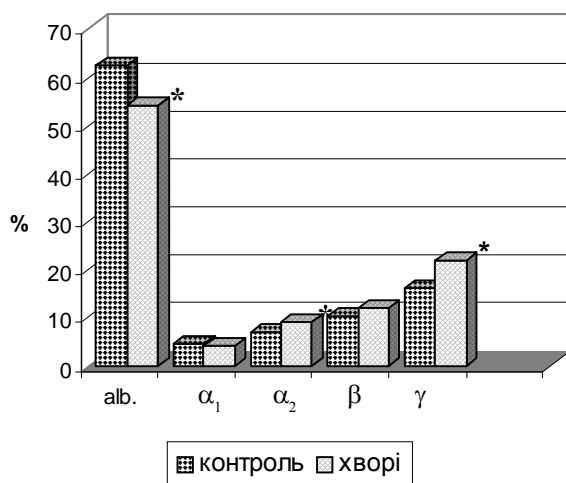


Рис. 2. Білковий спектр сироватки крові донорів та онкологічних хворих.

Примітка. Тут і на рисунку 3: відмінності між показниками донорів та хворих є вірогідними (* – $p \leq 0,05$).

Порівняльний аналіз білкового спектра крові в онкологічних хворих з різними групами крові не виявив вірогідної різниці між ними. Проте встановлено, що величина відхилень досліджуваних параметрів відносно показників контролю в обстежених із різною групою приналежності крові була неоднозначною.

Найбільш вираженими були зміни у білковому складі хворих з A(II) групою крові, в яких спостерігалися зниження вмісту альбумінів (48,96 %) і збільшення всіх глобулінових фракцій: α_1 -глобулінів – до 4,31 %, α_2 -глобулінів – до 8,68 %, β -глобулінів – до 10,96 % та γ -глобулінів – до 27,03 % (рис. 3). Значення альбумінів, α_2 - і γ -глобулінів були достовірно вірогідними ($p \leq 0,05$). При цьому значення

альбумінів і γ -глобулінів виходили за межі норми (в нормі рівень альбумінів становив 53-66 %, а γ -глобулінів – 11-21% відповідно).

Слід зауважити, що дослідження білкового складу в донорів з A групою крові показало, навпаки, зниження рівня α_1 - і α_2 -глобулінів до 3,91 та 6,40 % відповідно ($p \leq 0,05$).

У хворих з O(I) групою встановлено лише достовірне зменшення фракції α_1 -глобулінів, яка становила 3,21 % ($p \leq 0,05$). Рівень альбумінів, α_2 -, β -, γ -глобулінів складав 57,29, 8,48, 11,71, 19,32 % відповідно.

Зміни білкового складу крові в онкохворих з B(III) і AB(IV) групами відносно донорів виявилися закономірними (зменшення фракції альбумінів до 52,19 і 58,6 % та збільшення глобулінових фракцій: α_2 - (9,99 і 9,03 %), β - (11,65 і 12,63 %), γ -глобулінів (21,94 і 16,5 %)), однак статистично вірогідних відмінностей не спостерігали.

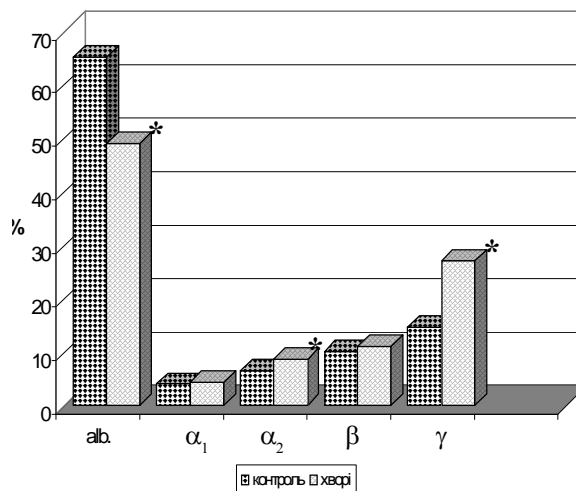


Рис. 3. Білковий спектр крові у донорів та онкохворих з A(II) групою крові.

Враховуючи те, що кожна електрофоретична фракція містить цілий ряд окремих білків, а зміни електрофоретичної картини можуть бути зумовлені змінами вмісту тільки тих білків, які в нормі в достатньо великих концентраціях містяться в сироватці, на нашу думку, збільшення α_2 -глобулінової фракції пов'язане зі зростанням вмісту двох основних білків, що мігрують в α_2 -зону, – гаптоглобіну і α_2 -макроглобуліну.

ВИСНОВКИ. На основі проведеного нами дослідження виявлено, що серед онкологічних хворих частіше трапляються особи з A(II) групою крові. Вивчення білкового спектра крові в онкологічних хворих дозволило встановити кількісний перерозподіл окремих фракцій: зниження рівня альбумінів та підвищення α_2 -, β - і γ -глобулінів, особливо у хворих з A(II) групою крові.

ЛІТЕРАТУРА

1. Герасимова Н.Д. Распределение эритроцитарных аллоантигенов и антител у онкологических больных: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: спец. 14.00.29. Гематологический научный центр РАМН. – М., 2003. – 20 с.
2. Зотиков Е.А. Антигены форменных элементов крови и антитела к ним (характеристика, методы определения, значение в медицине) // Клиническая диагностика. – 1999. – № 12. – С. 25-30.
3. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: В 2 т. – Мн.: Беларусь, 2000. – Т. 1. – 495 с.
4. Руководство по клинической лабораторной диагностике / Под ред. М.А. Базарновой, В.Т. Морозовой. – К.: Вища школа, 1986. – Ч. 3: Клиническая биохимия. – 276 с.
5. Титов В.Н., Амелюшкина В.А. Электрофорез белков сыворотки крови. – М.: Оптимум Пресс, 1994. – 85 с.
6. Урбах В.Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. – М.: Медицина, 1975. – 295 с.
7. Garratty G. Blood groups and disease: A historical perspective // Transfusion medicine reviews. – 2000. – **14**, № 4. – P. 291-301.
8. Gonzalez-Ordóñez A.J. Blood groups and disease // Med. Clin. (Barc). – 2005. – **125**, № 10. – P. 382-388.

ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ ГРУППАМИ КРОВИ АВ0 И БЕЛКОВЫМ СОСТАВОМ ИХ КРОВИ В ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

И.Б. Чень

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ В. ГНАТЮКА

Резюме

Изучено группы крови системы АВ0 и белковый состав у практически здоровых лиц и онкологических больных. Обнаружено, что среди больных чаще встречаются лица с А(II) группой крови. Установлено количественное перераспределение отдельных фракций белков крови в онкобольных. У больных с А(II) группой крови эти изменения были более существенными.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: группы крови, белки крови, онкологические больные.

THE CORRELATION BETWEEN THE BLOOD GROUPS AB0 AND THE BLOOD ALBUMIN IN ONCOLOGICALLY SICK PEOPLE

I.B. Chen

TERNOPIL NATIONAL PEDAGOGICAL UNIVERSITY BY V. HNATYUK

Summary

The work deals with the blood group AB0 and blood albumin in practically healthy and oncologically sick people. We have discovered that there are more representatives of A(II) blood groups among the sick. The quantitative redistribution of the separate blood albumin fraction in oncologically sick people is given in the research. These changes appeared to be the most sufficient in the people of A(II) blood groups.

KEY WORDS: blood groups, blood albumin, oncologically sick people.

Отримано 28.08.2009 р.

Адреса для листування: І.Б. Чень, Тернопільський національний педагогічний університет імені В.Гнатюка, вул. М. Кривоноса, 2, Тернопіль, 46027, Україна.

**МАТЕРІАЛИ
ВСЕУКРАЇНСЬКОЇ
НАУКОВО-ПРАКТИЧНОЇ КОНФЕРЕНЦІЇ**

**“ДОСЯГНЕННЯ І ПЕРСПЕКТИВИ
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ
БІОХІМІЇ”**

**8-9 жовтня 2009 року
м. Тернопіль**

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

ПОКАЗНИКИ БІОЕНЕРГЕТИЧНИХ ПРОЦЕСІВ І СТАН ПРО- Й АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМ В МІТОХОНДРІЯХ СЕРЦЯ СТАРИХ ЩУРІВ ЗА УМОВ ВВЕДЕННЯ КОМПЛЕКСУ ПОПЕРЕДНИКІВ ТА МОДУЛЯТОРА БІОСИНТЕЗУ УБІХІНОНУ

О.Б. Кучменко¹, Д.М. Петухов¹, І.Н. Євстратова², Н.М. Васілінчук²,
Л.С. Мхітарян², Г.В. Донченко¹

ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМЕНІ О.В. ПАЛЛАДІНА НАН УКРАЇНИ¹, КИЇВ
НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР "ІНСТИТУТ КАРДІОЛОГІЇ ІМЕНІ АКАД. М.Д. СТРАЖЕСКА" АМН
УКРАЇНИ², КИЇВ

При введенні комплексу біологічно активних сполук – попередників і модулятора біосинтезу убіхінону, який складається з α -токоферол ацетату, пара-оксибензойної кислоти і метіоніну, спостерігається корекція вікових змін вмісту убіхінону, функціонування ферментних систем ланцюга транспорту електронів у мітохондріях, інтенсивності вільнорадикального окиснення ліпідів і білків у мітохондріях серця. Вказаний комплекс може бути рекомендований для попередження порушень біоенергетичних процесів та інтенсифікації процесів окиснення ліпідів і білків, які мають місце при старінні.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **убіхінон, антиоксидант, мітохондрії, вільнорадикальне окиснення ліпідів і білків, старі тварини.**

ВСТУП. Процес біосинтезу убіхінону (CoQ) є складним багатостадійним процесом, який відбувається послідовно в різних субклітинних фракціях практично всіх тканин організму. Механізми регуляції ендогенного біосинтезу CoQ досить складні та реалізуються з участю різних факторів ендо- та екзогенної природи. CoQ відіграє центральну роль у біоенергетичних процесах в клітині, є важливим жиророзчинним антиоксидантом, який бере участь як у знешкодженні активних форм кисню (АФК), так і в регенерації інших антиоксидантів, перш за все вітаміну Е. Проте за певних умов CoQ може бути прооксидантом, що вказує на функціонування його як модулятора редокс-стану клітини при фізіологічних та патологічних станах, а також старінні [2, 16, 17]. При порушенні регуляції та рівня біосинтезу CoQ його кількість, що надходить з їжею, не може повністю забезпечити організм ссавців цим важливим продуктом, не кажучи вже про його лікувальний ефект. Отже, щоб задовольнити потреби організму в CoQ, необхідне додаткове надходження його ззовні у вигляді лікувальних препаратів, які використовують у терапії широкого спектра захворювань [2, 17]. Але лікувальний курс (5-6 місяців) коштує досить дорого, і,

що важливо, після його закінчення пригнічується ендогенний синтез CoQ.

Отже, метою роботи було дослідження дії попередників і модулятора біосинтезу CoQ, зокрема вітаміну Е, пара-оксибензойної кислоти (попередника синтезу бензохінонового ядра) та метіоніну (донора метильних груп у бензохіноновому ядрі молекули CoQ), на вміст CoQ, активність комплексів I, II і IV ЛТЕ, стан про- й антиоксидантної систем у тканинах серця дорослих і старих тварин.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. У дослідях використовували дорослих щурів-самців масою 150-220 г віком 6-7 місяців і старих щурів-самців масою 380-480 г віком близько 2-х років. Тварин було поділено на 3 групи: 1-ша група – контрольні (інтактні) дорослі тварини; 2-га група – контрольні (інтактні) старі тварини; 3-тя – старі тварини, які отримували α -токоферол ацетат (Е), ПОБК і М (комплекс ЕПМ). Щурів декапітували з урахуванням вимог Міжнародної конвенції з правил гуманного поводження з дослідними тваринами. Серця промивали в охолодженому розчині застосовуваного далі буфера, що містив 0,25 М розчин сахарози на 0,05 М трис(гідроксиметил)амінометані (рН 7,36), з додаванням розчину 0,001 М етиледіамінтетраацетату (ЕДТА). Тканини серця

© О.Б. Кучменко, Д.М. Петухов, І.Н. Євстратова,
Н.М. Васілінчук, Л.С. Мхітарян, Г.В. Донченко, 2009.

гомогенізували в 10-кратному об'ємі вказано-го буфера за допомогою скляного гомогенізатора Поттера-Ельвегейма. Методом диференційного центрифугування виділяли мітохондріальну фракцію [5]. Усі процедури проводили при 4 °С. У мітохондріях серця визначали вміст вітаміну Е і СоQ [3], активність сукцинат- і NADH-убіхіноноксидоредуктазних систем (SQR, NQR відповідно) [10, 18], цитохромоксидазну активність [1]. У мітохондріях серця оцінювали стан про- й антиоксидантної систем за вмістом дієнових кон'югатів (ДК) [6], ТБК-позитивних продуктів [7], продуктів вільнорадикального окиснення білків [4]. Білок визначали методом Лоурі [15]. Результати роботи оброблено за допомогою методів варіаційної статистики. Числові дані представлено у формі середньої величини зі стандартною помилкою ($M \pm m$). Достовірність різниці двох середніх величин оцінювали за критерієм Стюдента (t).

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. За старіння спостерігаються зміни в мітохондріях, що проявляються зростанням рівня генерації оксидантів, порушенням функціонування ланцюга транспорту електронів, зниженням надходження жирних кислот, що є підґрунтям для мітохондріальної теорії старіння [13]. Прогресивне зростання продукції вільних радикалів з віком корелює зі зменшенням числа функціонально активних мітохондрій в клітині, продукції АТФ, зниженням біосинтезу білка та витоком із мітохондрій перекису водню [12]. Ланцюг транспорту електронів є одним із основних джерел супероксиданіонного радикала; отже, міто-

хондрії акумулюють пошкодження, спричинені дією АФК, набагато швидше, ніж інші компартменти клітини, що призводить до розвитку мітохондріальної дисфункції та клітинної загибелі за багатьох патологічних станів і старіння [14].

Дослідження вмісту вітаміну Е в мітохондріях серця старих тварин показало, що за умов введення їм комплексу ЕПМ його вміст зростає в 1,8 раза (табл. 1) та є достовірно вищим за величини у дорослих щурів.

З віком спостерігається зростання окиснювальних пошкоджень внаслідок, з одного боку, інтенсифікації оксидативного стресу і зниження здатності мітохондрій синтезувати АТФ – з іншого. СоQ залучений до обох цих процесів як транспортер протонів і електронів у ланцюгу транспорту електронів у мітохондріях та потужний антиоксидант. Показано, що з віком вміст СоQ в гомогенатах тканин людини зменшується [11]. В інших дослідженнях продемонстровано відсутність змін вмісту СоQ в гомогенатах мозку та легенів, зростання в печінці та зниження в серці, нирках і скелетних м'язах [8]. Метою введення тваринам комплексу ЕПМ перш за все була активація процесів біосинтезу СоQ в організмі. У наших дослідженнях показано збільшення в мітохондріях серця вмісту СоQ в 1,5 раза порівняно зі старими щурами, які його не отримували (табл. 1).

Згідно з даними літератури, за старіння спостерігається пригнічення активності ферментних комплексів ланцюга транспорту електронів у мітохондріях [12]. Пошкодження мітохондріальної ДНК, що можуть мати місце за умов розвитку оксидативного стресу з віком,

Таблиця 1 – Показники біоенергетичних процесів і стан про- й антиоксидантних систем у мітохондріях серця дорослих і старих щурів та за умов введення їм комплексу ЕПМ ($M \pm m$), $n=6$

Група	Контроль – дорослі тварини	Контроль – старі тварини	Старі тварини + ЕПМ
Вітамін Е, мг/г білка	7,19±0,86	6,26±1,41	11,37±3,63*#
СоQ, мкг/г білка	1446,65±164,92	1896,72±252,79	2768,74±509,59*#
NQR-активність, ммоль окисненого NADH за 1 хв на 1 мг білка	64,54±19,3	133,41±9,68*	72,33±14,71#
SQR-активність, ммоль окисненого сукцинату за 1 хв на 1 мг білка	79,23±9,43	133,82±18,42*	141,43±23,35*
Цитохромоксидазна активність, мкмоль окисненого цитохрому с за 1 год на 1 мг білка	1,51±0,17	0,89±0,18*	3,12±0,89*#
Дієнові кон'югати, ум. од./мг білка	38,78±3,56	48,90±4,74*	25,70±2,67*#
ТБК-позитивні продукти, ум. од./мг білка	0,41±0,11	0,73±0,21*	0,25±0,01*#
Продукти вільнорадикального окиснення білків, ум. од./мг білка	0,116±0,007	0,136±0,003*	0,093±0,004*#

Примітка. * – різниця достовірна порівняно з контролем – дорослими тваринами ($p < 0,05$); # – різниця достовірна порівняно з контролем – старими тваринами ($p < 0,05$).

спричиняють зменшення активності ферментних комплексів ланцюга транспорту електронів у старих щурів [9]. Дослідження активності убіхінонзалежних ферментних систем показали, що активність NADH-убіхінон-оксидоредуктазної системи (NQR, комплекс I) зростає в мітохондріях серця старих контрольних тварин порівняно з дорослими (табл. 1). За умов введення комплексу попередників та модулятора біосинтезу CoQ спостерігаються зниження NQR-активності в 1,6 раза в мітохондріях серця старих дослідних тварин порівняно з контрольними старими щурами та повернення величини NQR-активності до значень у контрольних дорослих тварин (табл. 1). Активність сукцинат-убіхінон-оксидоредуктазної системи (SQR, комплекс II) в мітохондріях серця достовірно зростає у старих щурів порівняно з дорослими та не змінюється при введенні старим тваринам комплексу ЕПМ порівняно з контрольними старими щурами (табл. 1). Як вже було продемонстровано, вміст CoQ в мітохондріях серця старих тварин достовірно не змінюється порівняно з дорослими. Разом із цим, спостерігається зростання активності NQR та SQR в мітохондріях серця старих щурів порівняно з дорослими. При введенні комплексу ЕПМ має місце зниження NQR-активності до її рівня у дорослих тварин, хоча вміст CoQ при цьому достовірно збільшується. Можливо, при цьому зменшується доступність CoQ до даної ферментної системи. Активність SQR в мітохондріях серця старих тварин, які отримували комплекс ЕПМ, є достовірно вищою порівняно з дорослими тваринами (майже у 2 рази). Цитохромоксидазна активність достовірно знижується в мітохондріях серця старих контрольних тварин порівняно з дорослими, що цілком узгоджується з даними літератури [12]. Цікаво, що в мітохондріях серця старих щурів, які отримували ЕПМ, цитохромоксидазна активність зростає в 3,5 рази порівняно з контрольними старими тваринами (табл. 1) та вища навіть за величини у дорослих щурів, що може, в результаті, покращувати процеси дихання і є надзвичайно важливим саме для тканини серця. Можливо, такий ефект комплексу ЕПМ зумовлений захистом даного ферментного комплексу від дії пошкоджувальних агентів, зокрема вільних радикалів, а також впливом на рівень експресії компонентів комплексу.

Згідно з вільнорадикальною теорією старіння, порушення балансу між функціонуванням про- й антиоксидантних систем призво-

дить до значного зростання продукції вільних радикалів (понад фізіологічну норму) на тлі пригнічення функціональної активності антиоксидантних систем, що може стати причиною пошкодження нуклеїнових кислот, ліпідів та білків [13].

За даними літератури, при старінні спостерігається накопичення в тканинах продуктів вільнорадикального окиснення ліпідів та білків [3, 13]. Така тенденція мала місце і в наших дослідах (табл. 1). Отримані нами результати вказують на те, що за умов введення комплексу попередників та модулятора біосинтезу CoQ вміст первинних продуктів переокиснення ліпідів – ДК зменшується майже в 1,9 раза у мітохондріях серця порівняно зі старими контрольними тваринами та є достовірно нижчим за рівень ДК у дорослих щурів (табл. 1). Разом із цим, відбувається достовірне у 2,9 раза зменшення в мітохондріях серця тварин, які одержували комплекс ЕПМ, вмісту вторинних продуктів переокиснення ліпідів – ТБК-позитивних продуктів порівняно зі старими контрольними тваринами, які не отримували комплекс, а також дорослими щурами (табл. 1). У результаті проведених досліджень показано, що введення комплексу попередників і модулятора біосинтезу CoQ призводить до достовірного в 1,5 раза зменшення вмісту продуктів вільнорадикального окиснення білків у мітохондріях серця старих щурів порівняно зі старими контрольними тваринами (табл. 1). З аналізу представлених результатів стає очевидним, що введення комплексу ЕПМ зумовлює достовірне значне пригнічення процесів вільнорадикального окиснення ліпідів та білків. Імовірно, це відбувається за рахунок дії вітаміну Е як компонента досліджуваного комплексу, а також завдяки зростанню вмісту CoQ, які є потужними жиророзчинними антиоксидантами. Особливо важливо це для мітохондрій – потужного джерела генерації вільних радикалів у клітині.

ВИСНОВКИ. Комплекс, що складається з α -токоферол ацетату, ПОБК і метіоніну, здатен проявляти потужну антиоксидантну дію при старінні, не тільки інгібуючи надмірну активацію вільнорадикальних процесів окиснення ліпідів та білків, але й активуючи ендогенну наробку убіхінону, сполуки з вираженими антиоксидантними властивостями. При цьому також важливим є зростання вмісту вітаміну Е – модулятора біосинтезу CoQ і, разом з цим, потужного жиророзчинного антиоксиданта. З

наведених даних також видно, що застосування комплексу попередників та модулятора біосинтезу CoQ сприяє функціонуванню ферментних комплексів ланцюга транспорту електронів у мітохондріях, зокрема зростає цитохромоксидазна активність (комплекс IV) в мітохондріях серця.

Отже, використання комплексу ЕПМ – попередників та модулятора біосинтезу CoQ

сприяє корекції вікових змін вмісту CoQ, інтенсивності вільнорадикального окиснення ліпідів та білків у тканинах серця, а також впливає на функціонування ферментних систем ЛТЕ в мітохондріях. Вказаний комплекс може бути рекомендований для попередження порушень біоенергетичних процесів та надмірної інтенсифікації процесів окиснення ліпідів та білків, що спостерігаються з віком.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гулидова Г.П., Сорокина И.Н. Некоторые условия спектрофотометрического определения активности сукцинатдегидрогеназы и цитохромоксидазы в митохондриях мозга // Бюлл. эксперим. биол. и мед. – 1967. – **63**, № 1. – С. 41-44.
2. Донченко Г.В. Биохимия убихинона. – К.: Наук. думка, 1988. – 240 с.
3. Донченко Г.В., Коваленко В.Н., Забарная Е.Н. и др. Действие производных α -токоферола на содержание природных хинонов в тканях витамин Е-недостаточных крыс // Биохимия. – 1979. – **44**, № 5. – С. 923-930.
4. Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А. и др. Окислительная модификация белков крови человека: метод определения // Вопросы мед. химии. – 1995. – **41**, № 1. – С. 24-26.
5. Костерин С.А., Браткова Н.Ф., Курский М.Д. Роль сарколеммы и митохондрий в обеспечении кальциевого контроля расслабления миомерия // Биохимия. – 1985. – **50**, вып. 8. – С. 1350-1361.
6. Стальная И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных жирных кислот // Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С. 63-64.
7. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биологии / Под ред. В.Н. Ореховича. – М., 1977. – С. 44-46.
8. Beyer R.E., Burnett B., Cartwright K.J. et al. Tissue coenzyme Q (ubiquinone) and protein concentrations over the life span of the laboratory rat // Mech. Aging Dev. – 1985. – **32**, issue 2-3. – P. 267-281.
9. Filburn C.R., Edris W., Tamatani M. et al. Mitochondrial electron transport chain activities and DNA deletions in regions of the rat brain // Mech. Aging Dev. – 1996. – **87**, № 1. – P. 35-46.
10. Hatefi Y., Rieske J.S. Preparation and properties of DPNH-coenzyme Q reductase (Complex I of the Respiratory Chain): Methods in Enzymology. – New York, 1967. – **10**. – P. 235-239.
11. Kalen A., Appelkvist E.L., Dallner G. Age-related changes in the lipid compositions of rat and human tissues // Lipids. – 1989. – **24**, № 7. – P. 579-584.
12. Kumaran S., Subathra M., Balu M., Panneerselvam C. Age-associated decreased activities of mitochondrial electron transport chain complexes in heart and skeletal muscle: role of L-carnitine // Chemico-Biological interactions. – 2004. – **148**, № 1-2. – P. 11-18.
13. Kwong L.K., Shoal R.S. Age-related changes in activities of mitochondrial electron transport complexes in various tissues of the mouse // Arch. Biochem. Biophys. – 2000. – **373**, № 1. – P. 16-22.
14. Lenaz G. Role of mitochondria in oxidative stress and aging // Biochem. Biophys. Acta. – 1998. – **1336**, № 1-2. – P. 53-67.
15. Lowry O.H., Rosenbrough H.J., Parr A.L., Randall R.J. Protein measurement the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – **193**, № 1. – P. 265-275.
16. Meng Q., Wong Y.T., Chen J., Ruan R. Age-related changes in mitochondrial function and antioxidative enzyme activity in fischer 344 rats // Mechanism of Aging and Development. – 2007. – **128**, № 3. – P. 286-292.
17. Turunen M., Olsson J, Dallner G. Metabolism and Function of Coenzyme Q // BBA. – 2004. – **1660**, № 1-2. – P. 177-199.
18. Ziegler D., Doeg K.A. Preparation and properties of succinate dehydrogenase-coenzyme Q reductase (complex II): Methods in Enzymology. – New York, 1967. – **10**. – P. 231-235.

ПОКАЗАТЕЛИ БИОЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ И СОСТОЯНИЕ ПРО- И АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМ В МИТОХОНДРИЯХ СЕРДЦА СТАРЫХ КРЫС ПРИ ВВЕДЕНИИ КОМПЛЕКСА ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ И МОДУЛЯТОРА БИОСИНТЕЗА УБИХИНОНА

Е. Б. Кучменко¹, Д. Н. Петухов¹, И. Н. Евстратова², Н. Н. Василичук²,
Л. С. Мхитарян², Г. В. Донченко¹

ИНСТИТУТ БИОХИМИИ ИМЕНИ А. В. ПАЛЛАДИНА НАН УКРАИНЫ¹, КИЕВ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР "ИНСТИТУТ КАРДИОЛОГИИ ИМЕНИ АКАД. Н. Д. СТРАЖЕСКО"
АМН УКРАИНЫ², КИЕВ

Резюме

При введении комплекса биологически активных веществ – предшественников и модулятора биосинтеза убихинона, который состоит из α -токоферол ацетата, пара-оксибензойной кислоты и метионина, наблюдается коррекция возрастных изменений содержания убихинона, функционирования ферментных систем цепи транспорта электронов в митохондриях, интенсивности свободнорадикального окисления липидов и белков в митохондриях сердца. Указанный комплекс может быть рекомендован для предупреждения нарушений биоэнергетических процессов и интенсификации процессов окисления липидов и белков, которые имеют место при старении.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: убихинон, антиоксидант, митохондрии, свободнорадикальное окисление липидов и белков, старые животные.

EFFECT OF ADMINISTRATION OF PRECURSORS AND MODULATOR OF COENZYME Q BIOSYNTHESIS ON STATUS OF BIOENERGETICAL PROCESSES, PRO- AND ANTIOXIDANT SYSTEMS IN OLD RATS' HEART MITOCHONDRIA

O. B. Kuchmenko¹, D. M. Petukhov¹, I. N. Yevstratova², N. M. Vasilinchuk², L. S. Mkhitaryan²,
H. V. Donchenko¹

PALLADIN INSTITUTE OF BIOCHEMISTRY OF NAS OF UKRAINE¹, KYIV
NATIONAL SCIENTIFIC CENTRE "M. D. STRAZHESKO INSTITUTE OF CARDIOLOGY" OF AMS OF UKRAINE²,
KYIV

Summary

Administration of complex of biologically active substances that are precursors and modulators of coenzyme Q biosynthesis, which consists of α -tocopherol acetate, 4-hydroxybenzoic acid and methionine, leads to correction of age-related changes in coenzyme Q content, functioning of mitochondrial electron-transport chain enzyme systems, intensiveness of lipid and protein free-radical peroxidation in old rats' heart mitochondria. The complex can be recommended for prevention of misbalancing bioenergetical processes and intensification of lipid and protein peroxidation processes that occur during aging.

KEY WORDS: coenzyme Q, antioxidant, mitochondria, lipid and protein free-radical peroxidation, old animals.

Отримано 3.09.2009 р.

Адреса для листування: О. Б. Кучменко, Інститут біохімії імені О. В. Палладіна НАН України, вул. Леонтовича, 9, Київ, 01601, Україна.

ПОТЕНЦІЙНА НЕЙРОТОКСИЧНІСТЬ ХЛОРПІРИФОСУ І СПОСОБИ ЇЇ ВИВЧЕННЯ

Ю.Т. Салига

ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН УААН, ЛЬВІВ

Проведено моніторингове дослідження застосування препаратів на основі хлорпірифосу в Україні. Встановлено токсичну дію цього препарату на центральну нервову систему за допомогою тесту лабораторних тварин у водному лабіринті Морріса та в умовах культури клітин молодих гіпокампальних нейронів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: нейротоксичність, пестициди, хлорпірифос, центральна нервова система, нейрони, тест Морріса.

ВСТУП. Пестициди – токсичні речовини, їх сполуки або суміші речовин хімічного чи біологічного походження, призначені для знищення, регуляції та припинення розвитку шкідливих організмів, внаслідок діяльності яких уражаються рослини, тварини, люди і завдається шкода матеріальним цінностям, а також гризунів, бур'янів, деревної, чагарникової рослинності. Природа токсичності пестицидів різноманітна – це може бути канцерогенний або мутагенний ефект, дія на дихальну, ендокринну, імунну, нервову системи. Незважаючи на те, що цілий ряд аспектів впливу пестицидів на організм досить інтенсивно вивчається біологами, токсикологами, екологами та медиками вже багато років поспіль, питання впливу цих агрохімікатів на центральну нервову систему (ЦНС) залишається вкрай актуальним і потребує глибших та інтенсивніших досліджень. Дати повну оцінку всіх наслідків впливу пестицидів неможливо через недосконалість методів дослідження. Хоча вже нині достеменно відомо, що усі без винятку пестициди при ретельному вивченні проявляли або мутагенну, або інші негативні дії на живий організм. Навіть разові контакти людини з такими пестицидами, як діелдрин, паратіон, призводять до зміни показників енцефалограми, а вплив фосфоорганічних пестицидів (карбофос, хлорофос, трихлорметефос-3 та ін.), які швидко розкладаються, загрожує розвитком депресій, роздратування, розладом пам'яті, іншими нейропсихологічними порушеннями.

© Ю.Т. Салига, 2009.

Одним з найпоширеніших пестицидів у світі є хлорпірифос (О,О-Діетил-О-3,5,6-трихлор-2-піридилфосфорогіоат, $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$), а також препарати, до складу яких він входить. Його відносять до токсикантів-агоністів, що діють на специфічні рецептори, зокрема на холінорецептори, він викликає дифузне ураження нейронів центральної нервової системи. Механізм дії пов'язаний з пригніченням активності естераз, насамперед ацетилхолінестерази (АХЕ), яка відіграє важливу роль в передачі нервового імпульсу. За умов блокування цього ферменту пестицидом вільний ацетилхолін накопичується в синаптичній щілині, й нормальне проходження нервових імпульсів порушується – в результаті настає тремор (судомна активність м'язів), що переходить в параліч. Проте в останні роки з'явився цілий ряд наукових повідомлень про можливі інші механізми дії хлорпірифосу. Є дані про можливу токсичну дію цієї речовини на ріст і розвиток молодих нейронів [4, 5]. Хлорпірифос, крім інтенсивного використання в агропромисловому секторі, входить до складу багатьох побутових інсектицидних препаратів. Це може бути небезпечним, враховуючи ймовірні порушення у методах їх застосування.

Метою нашої роботи було проаналізувати рівень використання препаратів на основі хлорпірифосу в Україні, а також встановити його можливу токсичну дію на центральну нервову систему, в тому числі й на ранніх етапах її розвитку.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. З метою аналізу використання населенням та в агропромис-

ловому секторі України препаратів, до складу яких входить хлорпірифос, було проведено моніторингове дослідження всіх дозволених до застосування у нашій країні пестицидів.

Щоб дослідити вплив на функціональний стан ЦНС тварин хлорпірифосу, нами виконано дві серії експериментів. У першому досліді було сформовано три групи білих лабораторних щурів лінії Вістар двомісячного віку по 5 тварин у кожній групі (одна контрольна і дві дослідні розділені за статями). Тварини дослідних груп перорально одержували хлорпірифос упродовж 30 днів у дозі 15 мг/кг маси тіла. Протягом усього експерименту щурів утримували на стандартному раціоні віварію та збалансованому кормі, що містив усі необхідні компоненти. Тварини отримували питну воду без обмеження зі скляних пляшок місткістю 0,2 л. Хлорпірифос піддослідні тварини одержували щоранку перорально. Функціональний стан нервової системи щурів, зокрема їх пам'ять і здатність навчатися, досліджували за допомогою водного лабіринту Морріса за методикою Р. Prior et al. (1998) [3]. Використовували басейн діаметром 1,2 м та глибиною 40 см з переносною плексигласовою платформою, висотою 30 см. Під час проведення експериментів воду в басейні підігрівали до 36 °C і замутнювали сухим молоком. Усі досліди фіксували цифровою відеокамерою і зберігали у пам'яті комп'ютера для подальшого аналізу і статистичної обробки. Кожній тварині надавали до шести спроб для знаходження невидимої у замутненій воді платформи. Фіксували час, витрачений твариною у процесі досягнення цієї мети.

Другу серію досліджень було проведено на культурі нейронів 5-8-добового віку, гіпокампа щурів. Нейрони культивували у стандартних умовах та з додаванням в інкубаційне середовище хлорпірифосу. Протягом досліді проводили прижиттєвий морфологічний аналіз досліджуваних нейронів методом "Time-Lapse microscopy". При цьому за допомогою спеціалізованої комп'ютерної програми "NeuronJ" аналізували кількісні та якісні параметри дендритів першого, другого та третього рівнів галузження.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Ми провели моніторингове дослідження всіх дозволених до застосування в Україні пестицидів з метою виявлення таких, які можуть негативно впливати на центральну нервову систему і бути нейротоксично небезпечними. На сьогодні масштаби використання пестицидів в Україні становлять понад 300 діючих речовин, близько 400 препаративних форм на площі понад

40 млн га в кількості понад 36 тис. тонн [1]. Серед них значну частину займають різноманітні препарати, до складу яких входить хлорпірифос (табл. 1).

Такі пестициди можуть мати нейротоксичний вплив на людину. Особливо вразливим до їх впливу може бути мозок на ранніх стадіях онтогенезу. На жаль, сучасні вимоги тестування з безпеки хімічних препаратів не завжди включають в себе дослідження факторів впливу на нервову систему, особливо на стадії розвитку людського плода. Епідеміологічні дослідження доводять, що багато пестицидів, які використовують на даний час в Європі, в тому числі органофосфати, можуть викликати інтоксикацію на стадії раннього розвитку нервової системи [2]. Ці впливи можуть бути несприятливими для розвитку мозку із серйозними й незворотними наслідками.

Метод, запропонований шотландським вченим Р. Моррісом, став класичним у дослідженні впливу певних чинників на функціонування ЦНС тварин. Принцип методу полягає в тому, що піддослідну тварину випускають у басейн із замутненою водою. З басейну немає виходу, але в ньому встановлюють у певному місці невидиму для щура підводну платформу, яка служить для нього місцем відпочинку. Віднайшовши цю платформу, тварина може вибратись із води. Щура, який знайшов платформу, виймають з басейну, а через деякий час знову випускають плавати, але вже з іншої стартової позиції. Поступово час, який проходить від старту тварини до віднайдення платформи, скорочується, а шлях спрощується, що свідчить про формування у щура уявлення про просторове розміщення платформи на основі зовнішніх орієнтирів. За допомогою тесту Морріса можна оцінити динаміку формування твариною просторової навички, стратегію її поведінки в ході досліді, встановити відмінності у поведінці щурів. Даний тест дуже широко застосовують у нейротоксикологічних дослідженнях, він був обраний нами для встановлення впливу на функціональний стан ЦНС тварин хлорпірифосу. В результаті аналізу отриманих даних було з'ясовано, що хлорпірифос знижував ефективність виконання піддослідними тваринами тесту Морріса на 5-10 %, що свідчить про нейротоксичну небезпеку препарату. Слід також відзначити, що хлорпірифос у жодній із випробуваних доз не впливав на загальний стан піддослідних щурів та не викликав загибелі тварин.

Для встановлення можливої нейротоксичної дії хлорпірифосу на ріст і розвиток нейронів було досліджено вплив на них цього препа-

Таблиця 1 – Дозволені до використання в Україні пестициди на основі хлорпірифосу

№ з/п	Дата реєстрації	Реєстраційне посвідчення, серія, номер	Назва препарату та препаративна форма	Виробник препарату та преп. форми	Сфера застосування	Термін реєстрації препарату, дата
1	17.01.08	А 01427	Піринекс, 48 к.е. (хлорпірифос, 480 г/л)	Ф. Мактешим Кемікал Ворс Лтд., Ізраїль, член групи компаній Мактешим-Аган Індастріз	Контактно-системний інсектоакарицид (озима та яра пшениця)	31.12.2012
2	23.04.08	А 01562	Нурел Д, к.е. (хлорпірифос, 500 г/л + циперметрин, 50 г/л)	Ф. Доу АгроСайенсіс, Кінг'з-Лінн, Великобританія	Інсектицид (озимий та ярий ріпак, гірчиця)	31.12.2012
3	29.01.08	Б 01505	Суперкіл, 440, к.е., (хлорпірифос, 400 г/л + циперметрин, 40 г/л)	Ф. "Агрifar С.А.", Огри, Бельгія	Інсектицид (цукрові буряки, ріпак озимий та ярий)	31.12.2009
4	20.05.08	А 01574	Піринекс, 48 к.е., (хлорпірифос, 480 г/л)	Ф. Мактешим Кемікал Ворс Лтд., Ізраїль, член групи компаній Мактешим-Аган Індастріз	Інсектицид (озима та яра пшениця, цукрові буряки, картопля, яблуна)	31.12.2012
5	10.04.08	Б 01671	Кілер, к.е., (хлорпірифос, 500 г/л + циперметрин, 50 г/л)	Ф. Трастхім Ко. Лтд., Нанджин, Китай	Інсектицид (озима пшениця)	31.12.2009
6	22.02.08	Б 01606	Ципі Плюс к.е., (хлорпірифос, 480 г/л + циперметрин, 50 г/л)	Ф. Агротрейд ООД, Болгарія; ТОВ "ЗПФ Агрорус-Рязань", Російська Федерація	Інсектицид (озима пшениця, цукрові буряки, яблуна)	31.12.2009
7	13.06.08	А 01577	Суперкіл, 440, к.е. (хлорпірифос, 400 г/л + циперметрин, 40 г/л)	Ф. "Агрifar С.А.", Огри, Бельгія	Інсектицид (цукрові буряки, озимий та ярий ріпак, озима та яра пшениця, ярий ячмінь, картопля, яблуна)	31.12.2012
8	16.02.09	Б01786	Дурсбан Ультра, к.е., інсектицид	Жахай Кваоджи Оверсіс Трейд Компані Лтд., Китай, на замовлення ПП "Кемілайн Агро", Україна	Яблуна, хмільники, виноградники (технічні сорти)	31.12.2009
9	24.02.09	А01739	Дурсбан, 480 к.е., інсектицид	Ф. Доу АгроСайенсіс, Кінг'з-Лінн, Великобританія	Картопля, хміль, люцерна (насінневі посіви), яблуна, персик	31.12.2018
10	28.01.08	А 01467	Фурадан, т.пс., (карбофуран, 350 г/л)	Ф. ФМСі, Джексонвіль, США	Інсектицид для протруювання насіння (цукрові та кормові буряки)	31.12.2012

рату в умовах культури клітин. У наших експериментах ми протягом трьох діб відслідковували кількісні та якісні показники молодих нейронів гіпокампа в культурі клітин за нормальних умов та при внесенні у середовище культивування слідових концентрацій хлорпі-

рифосу. В результаті було встановлено достовірний токсичний ефект хлорпірифосу, який полягав у зменшенні кількості життєздатних нейронів у середньому на 20 % порівняно з контролем, а також негативно впливав на ріст і розвиток, що свідчить про нейротоксичну

небезпеку препарату і необхідність подальших досліджень в цьому напрямку.

ВИСНОВКИ. 1. Хлорпірифос та препарати на його основі є одними з найпоширеніших пестицидів, які сьогодні застосовують в Україні. У досліджах на лабораторних щурах та в умовах нейрональної культури клітин виявлено

нейротоксичну дію хлорпірифосу, що вказує на необхідність проведення подальших його досліджень з метою уникнення можливих уражень ЦНС тварин та людини.

2. Потрібно запобігати потраплянню пестицидів на основі хлорпірифосу, як і інших груп нейротоксинів, у продукти харчування та інші джерела впливу на людину.

ЛІТЕРАТУРА

1. Перелік пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні: Каталог / За ред. М.В. Єременко, М.І. Ткачук, Н.В. Любач та ін. – Дніпропетровськ: АРТ-ПРЕС, 2006. – 312 с.

2. Bjarling-Poulsen M., Andersen H.R., Grandjean P. Potential developmental neurotoxicity of pesticides used in Europe // *Environmental Health*. – 2008. – **50** (7). – P. 491-510.

3. Cory-Slechta D.A. Studying toxicants as single chemicals: does this strategy adequately identify

neurotoxic risk? // *Neurotoxicology*. – 2005. – **26** (4). – P. 491-510.

4. Delgado E., McConnell R., Miranda J. et al. Central nervous system effects of acute organophosphate poisoning in a two-year follow-up // *Scand. J. Work Environ. Health*. – 2004. – **30** (5). – P. 362-370.

5. Poet T.S., Kousba A.A., Dennison S.L., Timchalk C. Physiologically based pharmacokinetic/pharmacodynamic model for the organophosphorus pesticide diazinon // *Neurotoxicology*. – 2004. – **25** (6). – P.1013-1030.

ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ НЕЙРОТОКСИЧНОСТЬ ХЛОРПИРИФОСА И СПОСОБЫ ЕЕ ИЗУЧЕНИЯ

Ю.Т. Салыга

ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ЖИВОТНЫХ УААН, ЛЬВОВ

Резюме

Проведено мониторинговое исследование применения препаратов на основании хлорпирифоса в Украине. Установлено токсическое действие этого препарата на центральную нервную систему с помощью теста лабораторных животных в водном лабиринте Морриса и в условиях культуры клеток молодых гиппокампиальных нейронов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: нейротоксичность, пестициды, хлорпирифос, центральная нервная система, нейроны, тест Морриса.

POTENTIAL NEUROTOXICITY OF CHLORPYRIFOS AND METHODS OF ITS INVESTIGATION

Yu.T. Salyha

INSTITUTE OF ANIMAL BIOLOGY OF UAAS, LVIV

Summary

It was carried out monitoring investigation of application of chemicals on basis of the chlorpyrifos in Ukraine. Using Morris water maze test and hippocampal cell culture methods, the toxic effect of this pesticide on the central nervous system of laboratory animals was shown.

KEY WORDS: neurotoxicity, pesticides, Chlorpyrifos, central nervous system, neurons, Morris test.

Отримано 16.09.2009 р.

Адреса для листування: Ю.Т. Салыга, Інститут біології тварин УААН, вул. В. Стуса, 38, Львів, 79034, Україна.

ВПЛИВ ОКСІЕТИЛЬОВАНИХ АЛКІЛ- ТА ІЗОНОНІЛФЕНОЛІВ НА ОБМІН КУПРУМУ Й АКТИВНІСТЬ ЦЕРУЛОПЛАЗМІНУ В ЕКСПЕРИМЕНТІ НА ГОМОЙОТЕРМНИХ ТВАРИНАХ

В.А. Бондаренко, В.Н. Зовський, С.А. Наконечна
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ В.Н. КАРАЗІНА
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

У роботі досліджено склад мікроелемента купруму в серці, печінці, нирках, надниркових залозах, селезінці, сироватці крові в токсикологічному досліді на білих щурах лінії Вістар після 45-добової пероральної затравки водними розчинами 1/10, 1/100 та 1/1000 ДЛ₅₀ неонолів марок АФ 9-12 й АФС 9-6 КМ. Встановлено, що під впливом ксенобіотиків порушується баланс вмісту мікроелемента в органах і тканинах організму на фоні зниження активності купрумвмісного ферменту церулоплазміну.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: мікроелементи, купрум, церулоплазмін, ксенобіотики, щури лінії Вістар.

ВСТУП. Численні літературні дані свідчать про те, що, незважаючи на свою невисоку біологічну активність, детергенти мають складний вплив на організм [1]. Недостатньо вивченим є питання впливу поверхнево-активних речовин (ПАР) різного походження на баланс мікроелементів організму теплокровних тварин. Предметом нашого дослідження були ПАР, що входять до складу синтетичних мийних засобів вітчизняного виробництва, які мають широке застосування в побуті серед населення і можуть потрапляти зі стічними водами в джерела господарсько-питного призначення. У зв'язку з важливою роллю купруму в різних структурно-метаболических процесах, вивчення його обміну становить значний інтерес при впливі на організм фізичних і хімічних факторів у формуванні патологічних станів [2, 4, 6]. Іони купруму мають важливе значення в забезпеченні функціональної активності оксидази сироватки крові – церулоплазміну – багатофункціонального купрумвмісного білка, що бере участь у підтримці окиснювально-відновного гомеостазу [3].

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. У роботі вивчали вміст мікроелемента купруму в серці, печінці, нирках, надниркових залозах, селезінці, сироватці крові статевозрілих щурів-самців лінії Вістар, яких піддавали впливу речовин на ос-

нові оксіетильованих алкіл- та ізононілфенолів марок АФ 9-12 і АФС 9-6 КМ, які вводили щодня вранці натще за допомогою металевого зонда перорально в дозах 1/10, 1/100 і 1/1000 ДЛ₅₀ протягом 45 діб. Вміст іона металу визначали атомно-абсорбційним методом [5]. Для визначення активності церулоплазміну в сироватці крові був використаний загальноприйнятий метод Ravina (1961) у модифікації В.Г. Колб, В.С. Камышнікова [7]. Вірогідність результатів оцінювали за допомогою t-критерію Стюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Результати дослідів показали, що неонолі груп АФ 9-12 і АФС 9-6 КМ, діючи на організм, призводять в основному до перерозподілу мікроелемента купруму в органах і тканинах експериментальних тварин.

Більш значимі зміни динаміки мікроелемента виявлено під впливом АФС 9-6 КМ, що підвищував у сироватці крові вміст іона металу на 69,8 % у токсичній дозі й на 50,3 % у діючій дозі (табл. 1). Такі ж зміни викликав неонол АФ 9-12, але меншою мірою. Відзначено достовірне збільшення вмісту іона металу під впливом дози 1/10 ДЛ₅₀ поверхнево-активної речовини АФ 9-12 неіоногенного походження на 15,9 % у надниркових залозах і на 10,9 % під впливом речовини АФС 9-6 КМ аніонного типу в тій же дозі, що може пояснюватися іммобілізацією захисних механізмів

Таблиця 1 – Динаміка вмісту купруму в організмі білих щурів під впливом неонолів АФ 9-12 і АФС 9-6 КМ (мг/100 м тканини)

Речовина	Доза ДЛ ₅₀	Органи (M±m)					
		Сироватка крові	Печінка	Надниркові залози	Нирки	Серце	Селезінка
АФ 9-12	1/10	67,22±5,06*	8,05±1,37*	55,92±2,66*	16,55±1,09	0,45±0,06*	0,39±0,02
	1/100	63,41±4,23*	9,35±0,45	51,22±2,43	17,33±1,77	0,53±0,05*	0,37±0,03
	1/1000	53,00±2,45	9,65±0,58	49,33±1,70	17,54±2,02	0,69±0,07	0,34±0,01
К-ль	Вода	46,43±0,79	9,85±0,37	48,23±1,82	17,72±1,67	0,75±0,04	0,36±0,03
АФС 9-6 КМ	1/10	73,99±6,55*	6,53±2,56	50,22±2,27*	21,10±2,27	0,60±0,06*	0,38±0,07
	1/100	65,44±9,31*	6,02±1,45	46,67±2,37	22,90±1,92	0,76±0,06*	0,36±0,08
	1/1000	53,22±8,15	7,77±0,91	44,24±2,23	23,20±3,27	0,80±0,09	0,38±0,08
К-ль	Вода	43,55±2,33	8,88±0,34	45,29±2,53	22,50±2,08	0,90±0,05	0,37±0,04

Примітка. * – відмінність від контролю вірогідна (p<0,05).

організму тварин. Достовірне зниження вмісту Cu²⁺ на 40 % у серці й на 18,3 % у печінці (АФ 9-12) є однією з причин інактивації моноаміноксидази, що може призвести до порушення обміну біогенних моноамінів, які є медіато-

рами дії регуляторних систем. При впливі неонолів знижувалася на 50 % активність купрумвмісного ферменту – церулоплазміну, що відіграє велику роль в окиснювально-відновних процесах в організмі (табл. 2).

Таблиця 2 – Вплив ПАР на активність церулоплазміну сироватки крові білих щурів під впливом неонолів АФ 9-12 і АФС 9-6 КМ після закінчення підгострого дослідження

Сполука	Доза від ДЛ ₅₀	Церулоплазмін (од. екст.)
АФ 9-12	1/10	30,2±1,3*
	1/100	48,3±1,8*
АФС 9-6 КМ	1/10	31,0±1,2*
	1/100	47,2±1,3*
Контроль	Вода	60,4±2,1

Примітка: * – відмінності достовірні (p<0,05).

ВИСНОВКИ. Оксіетильовані алкіл- та ізонілфеноли в дозах 1/10 і 1/100 ДЛ₅₀ знижують вміст купруму у внутрішніх органах і підвищують його в крові. Доза 1/1000 ДЛ₅₀ не діюча. Зміна динаміки мікроелемента може

свідчити про токсичну дію неонолів. Більшою мірою порушення фонду мікроелемента виявляли в серці й сироватці крові, що тісно корелює зі зміною активності металоферменту сироватки крові – церулоплазміну.

ЛІТЕРАТУРА

1. Авцын А.П., Жаворонков А.А., Риш М.А., Строчкова Л.С. Микроэлементозы человека. – М.: Медицина, 1991. – 496 с.
2. Бандурин О.Ю. Микроэлементный состав жовчі при патології жовчного міхура // Лаб. діагностика. – 2006. – № 2 (36). – С. 17-21.
3. Барабой В.А., Сутковой Д.А. Окислительно-антиоксидантный гомеостаз в норме и патологии: В 2-х частях / Под ред. Ю.А. Зозули. – К.: Чернобыль-интеринформ, 1997. – Ч. 1. – 200 с.
4. Боев В.М., Перминова Л.А., Быстрых О.В. и др. Оценка микроэлементного профиля у детей со злокачественными новообразованиями // Микроэлементы в медицине. – 2004. – № 5 (2). – С. 11-14.
5. Брицке М.Е. Атомно-абсорбционный спектрхимический анализ. – М.: Химия, 1982. – 280 с.
6. Ефремов А.В., Антонов А.Р., Литвинова Т.А. и др. Комплексная оценка и способы коррекции минерального гомеостаза на фоне инфаркта миокарда // Пат. физиол. и эксперим. терапия. – 2006. – № 1. – С. 22.
7. Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии. – Минск: Беларусь, 1982. – 365 с.

ВЛИЯНИЕ ОКСИЭТИЛИРОВАННЫХ АЛКИЛ- И ИЗОНОНИЛФЕНОЛОВ НА ОБМЕН МЕДИ И АКТИВНОСТЬ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА ТЕПЛОКРОВНЫХ ЖИВОТНЫХ

В.А. Бондаренко, В.Н. Зовский, С.А. Наконечная
ХАРЬКОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ В.Н. КАРАЗИНА
ХАРЬКОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

Резюме

В работе исследован состав микроэлемента меди в сердце, печени, почках, надпочечниках, селезенке, сыворотке крови в токсикологическом опыте на белых крысах линии Вистар после 45-суточной пероральной заправки водными растворами 1/10, 1/100 и 1/1000 DL_{50} неонолов марок АФ 9-12 и АФС 9-6 КМ. Установлено, что под действием ксенобиотиков нарушается баланс содержания микроэлемента в органах и тканях организма на фоне снижения активности медьсодержащего фермента церулоплазмина.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: микроэлементы, медь, церулоплазмин, ксенобиотики, крысы линии Вистар.

INFLUENCE OF OXYETHILIZED ALKYL- AND ISONONILPHENOLS UPON CUPRUM IONS METABOLISM AND ACTIVITY OF CERULOPLASMIN IN EXPERIMENT ON WARM-BLOODED ANIMALS

V.A. Bondarenko, V.N. Zovsky, S.A. Nakonechna
KHARKIV NATIONAL UNIVERSITY BY V.N. KARAZIN
KHARKIV NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY

Summary

The composition of microelement cuprum in the heart, liver, kidneys, adrenal glands, spleen, blood serum was studied in toxicological experiment on white rats of Vistar line after 45 days of peroral feeding by water solution 1/10, 1/100 and 1/1000 DL_{50} neonols of marks AF 9-12 and AFS 9-6 KM. It was revealed that under action of xenobiotics the balance of content of microelement in organs and tissues is disturbed against the background of decrease of activity of cuprum – containing ferment ceruloplasmin.

KEY WORDS: microelements, cuprum, ceruloplasmin, xenobiotics, rats of Vistar line.

Отримано 14.09.2009 р.

Адреса для листування: С.А. Наконечна, вул. Гршмана, 17, кв. 120, Харків, 61002, Україна.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

ЛЕКТИНОЦИТОХІМІЧНИЙ АНАЛІЗ СІАЛОВІСНИХ ГЛІКОПРОТЕЇНІВ МЕМБРАН МОНОНУКЛЕАРНИХ ЛЕЙКОЦИТІВ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ЗА УМОВ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 1-ГО ТИПУ

І.В. Бродяк¹, М.І. Здіорук¹, М.Л. Барська², О.І. Вовк², Н.О. Сибірня¹
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА¹
ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ КЛІТИНИ НАН УКРАЇНИ², ЛЬВІВ

Проведено визначення загальної кількості сіалованих глікокон'югатів мембран мононуклеарних лейкоцитів крові за умов цукрового діабету 1-го типу при використанні лектину зародків пшениці. Застосування лектину акації амурської та лектину бузини чорної дозволило диференціювати різні типи зв'язків (($\alpha 2 \rightarrow 3$) і ($\alpha 2 \rightarrow 6$)) для залишків сіалових кислот у структурі вуглеводних детермінант глікопротеїнів мононуклеарних лейкоцитів периферичної крові у нормі та за умов досліджуваної патології.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: мононуклеарні лейкоцити, сіаловісні глікопротеїни, цукровий діабет.

ВСТУП. Мононуклеарні (МН) лейкоцити периферичної крові викликають низку патогенетичних змін за умов цукрового діабету (ЦД) 1-го типу [1]. Ці імунікомпетентні клітини можуть брати безпосередню участь у виникненні судинних ускладнень при діабеті [7]. Механізм пошкодження ендотелію судин лейкоцитами остаточно не з'ясовано. Відомо, що взаємодію між лейкоцитами та ендотеліоцитами забезпечують три родини адгезивних молекул, більшість з яких входить до складу мембранних рецепторів лейкоцитів і за хімічною структурою є сіалоглікопротеїнами. Зростання кількості експонованих на поверхні клітин сіалоглікокон'югатів корелює з пошкодженням багатьох типів клітин [10]. Для дослідження перерозподілу за структурними особливостями та кількості вуглеводних детермінант у складі глікопротеїнових рецепторів клітинної мембрани у нормі та при патології як молекулярні зонди застосовують лектини [2]. За клітинно-клітинних взаємодій важливою може бути не лише наявність певного глікокон'югату (в даному випадку сіалової кислоти), а і вид зв'язку, яким він приєднаний до корової частини олігосахариду. Тому метою роботи було дослідити вміст глікокон'югатів мембран МН лейкоцитів, які у структурі вуглеводного компонента мають сіалові кислоти; з'ясувати структурні особливості олігосахаридних компонентів мембранних глікопротеїнів мононуклеарів у нормі та за умов ЦД 1-го типу.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Об'єктом дослідження слугували МН лейкоцити периферичної крові здорових донорів та людей, хворих на ЦД 1-го типу. Для лектиноцитохімічного аналізу використовували лектини, мічені пероксидазою хрому ("Лектинотест", Україна):

– WGA – лектин зародків пшениці (специфічний до N-ацетил- β ,D-глюкозаміну (β ,DglcNAc) і N-ацетилнейрамінової (NeuNAc) (сіалової) кислоти);

– MAA – лектин акації амурської (афінний до послідовності N-ацетил-нейрамінова кислота-($\alpha 2 \rightarrow 3$)-D-галактоза/N-ацетил-D-галактоза (NeuNAc($\alpha 2 \rightarrow 3$)DGal/DgalNAc), не зв'язує при цьому дисахаридних фрагментів, з'єднаних ($\alpha 2 \rightarrow 6$)-глікозидним зв'язком);

– SNA – лектин бузини чорної (специфічний до послідовності NeuNAc($\alpha 2 \rightarrow 6$)DGal/DgalNAc, не зв'язує при цьому послідовності NeuNAc($\alpha 2 \rightarrow 3$)DGal/DgalNAc в олігосахаридах).

Мононуклеари виділяли з венозної гепаринізованої крові (кінцеве розведення гепарин:цільна кров=1:100) у градієнті густини з використанням Gradisol-G ("Aqua-medica", Польща) згідно з інструкцією фірми-виробника. Після центрифугування клітини двічі відмивали забуференим фосфатами фізіологічним розчином (ЗФР, pH 7,4). Життєздатність клітин у тесті з трипановим синім була не меншою 98 %.

Для лектиноцитохімічного дослідження [3] із суспензії МН виготовляли мазки, які фіксували сумішшю у співвідношенні ацетон:метанол:формалін=19:19:2 протягом 5 хв при температурі +4 °С з наступним висушуванням при кімнатній температурі. Після регідрації та про-

© І.В. Бродяк, М.І. Здіорук, М.Л. Барська, О.І. Вовк, Н.О. Сибірня, 2009.

мивання ЗФР (рН 7,4) мазки обробляли 70 % метанолом, що містив 5 % H_2O_2 , для пригнічення активності ендогенної пероксидази з наступним промиванням мазків у 3-х змінах ЗФР по 5 хв. Проводили інкубацію з лектинами WGA, SNA, MAA, міченими пероксидазою хрому в концентрації 50 мкг/мл, розчиненими в ЗФР. Після 2-годинної інкубації при кімнатній температурі промивали препарати у 3-х змінах ЗФР по 10 хв. Для контролю за специфічністю реакції ділянки мазків, обмежених восковим олівцем DAKO-реп, в одному випадку інкубували без лектину із ЗФР, в іншому – за присутності 0,5 М вуглевода-інгібітора взаємодії лектину із сіаловою кислотою (N-ацетил- β ,D-глюкозаміну). Для виявлення в клітинах місць зв'язування міченого пероксидазою лектину використовували розчин 0,05 % 3,3'-діамінобензидину тетрагідрохлориду і 0,015 % H_2O_2 на ЗФР, інкубацію проводили 3-5 хв при кімнатній температурі з наступним промиванням у 3-х змінах дистильованої води по 5 хв. Активність пероксидазної реакції і, відповідно, локалізацію зв'язаного з глікокон'югатами лектину визначали за коричневими відкладеннями продуктів окисної полімеризації діамінобензидину в режимі світлової мікроскопії при збільшенні $\times 1200$ під імерсійним маслом. Інтенсивність зв'язування лектину оцінювали за шкалою: (-) 0 – немає забарвлення; (+) 1 – слабе забарвлення; (++) 2 – забарвлення помірної інтенсивності; (+++) 3 – інтенсивне забарвлення. Для визначення середньої кількості клітин з позитивною пероксидазною реакцією підраховували суму клітин з інтенсивністю реакції +++, ++, +; всього нараховували 400 клітин на мазку.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. За наростанням інтенсивності зв'язування від слабкої

до сильної з мембраною МН (як у контрольних донорів, так і у хворих) лектини можна розташувати в такій послідовності: SNA, MAA, WGA (табл. 1, рис. 1).

При використанні лектину WGA кількість клітин з оцінкою за інтенсивністю зв'язування у 2 і 3 бали достовірно збільшувалась при патології. Отримані нами дані свідчать про підвищення вмісту β ,DGlcNAc і NeuNAc в складі рецепторів плазматичної мембрани МН у пацієнтів з ЦД 1-го типу.

Підвищена кількість МН з позитивною пероксидазною реакцією за дії лектину SNA свідчить про зростання вмісту NeuNAc($\alpha 2 \rightarrow 6$)DGal/DgalNAc дисахаридних фрагментів у складі мембранних рецепторів лейкоцитів при патології (табл. 1, рис. 1). З літератури відомо, що ($\alpha 2 \rightarrow 6$)-приєднані сіалові кислоти здебільшого виявляють на CD19⁺-лейкоцитах (Pan-B-лімфоцитарний антиген) [15]. Цей рецептор задіяний у процесі ініціації при антигенній стимуляції В-лімфоцитів (його цитоплазматична частина фосфорилується, що призводить до приєднання Src-кінази із залученням фосфатидилінозитол 3'-кінази (PI-3'-кінази)) [5, 11]. Отримані результати SNA-специфічного цитохімічного аналізу МН у хворих на ЦД 1-го типу підтверджують наші попередні дані про підвищення кількості CD19⁺-лейкоцитів з одночасною інтенсифікацією антитілоутворювальної функції В-клітин [4] і вказують на домінування гуморального типу імунної відповіді, за яку відповідають В-лімфоцити, над Т-клітинною специфічною імунною відповіддю за умов досліджуваної патології.

Взаємодія лектину MAA з NeuNAc($\alpha 2 \rightarrow 3$)DGal/DgalNAc-термінальними залишками глікокон'югатів плазматичної мембрани МН лейкоцитів за умов ЦД була помітно пригнічена порівняно з показниками у здорових донорів.

Таблиця 1 – **Ступінь зв'язування лектинів з вуглеводними детермінантами мембранних глікопротеїнів мононуклеарних лейкоцитів крові здорових донорів та хворих на цукровий діабет 1-го типу (M \pm m; n=18-21)**

Умови		Показник			
		Кількість МН з негативною і позитивною пероксидазною реакцією			
		0 (-)	1 (+)	2 (++)	3 (+++)
WGA	Контроль	8,0 \pm 2,69	298,94 \pm 12,94	78,11 \pm 7,66	14,94 \pm 3,94
	ЦД 1-го типу	1,06 \pm 0,82*	140,81 \pm 9,28*	167,81 \pm 9,98*	90,25 \pm 6,04*
SNA	Контроль	324,11 \pm 10,58	75,89 \pm 4,59	-	-
	ЦД 1-го типу	294,13 \pm 8,02	105,88 \pm 9,93*	-	-
MAA	Контроль	140,25 \pm 9,28	257,00 \pm 13,44	2,25 \pm 0,97	-
	ЦД 1-го типу	168,80 \pm 7,14*	231,20 \pm 11,18	0,50 \pm 0,22	-

Примітка. Вірогідність відмінностей порівняно з показниками у контролі: * – $p < 0,05$.

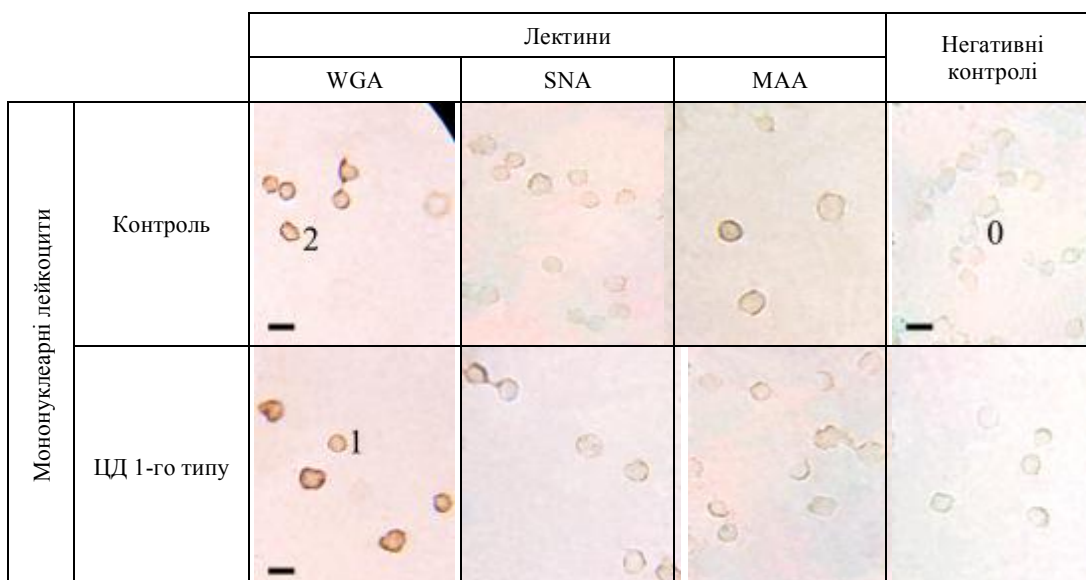


Рис. 1. Лектиноцитохімічний аналіз лейкоцитів крові здорових донорів та хворих на ЦД 1-го типу. Інкубація з лектинами, міченими пероксидазою хрому, візуалізація в системі "діамінобензидин- H_2O_2 ". Цифрові позначення інтенсивності пероксидазної реакції: 0 – негативна реакція; 1 – слабка позитивна реакція; 2 – помірна позитивна реакція. Негативні контролю – попередня інкубація з відповідними інгібіторами до лектинів. Збільшення $\times 1200$. Bar=10 мкм.

У літературі зустрічаються дані про те, що $CD3^+$ -лейкоцитарний рецептор містить ($\alpha 2 \rightarrow 3$)-приєднані сіалові кислоти, які можна визначити за допомогою лектину MAA [8, 13, 15]. Водночас показано, що порушення структури вуглеводної детермінанти глікопротеїнової субодиниці $CD3\text{-}\gamma$ або $CD3\text{-}\epsilon$ у складі $CD3$ -рецептора призводить до пригнічення дозрівання Т-клітин і, як наслідок, до розвитку імунodefіцитів [6, 9, 14]. При ЦД 1-го типу імунцитохімічним методом було виявлено зменшення кількості $CD3$ Pan Т-антигену [4]. Тому зниження кількості ($\alpha 2 \rightarrow 3$)-приєднаних сіалових кислот на фоні підвищення кількості ($\alpha 2 \rightarrow 6$)-зв'язаних сіалових кислот на поверхні МН розкриває молекулярний механізм, що опосередковує пригнічення активності Т-лімфоцитів за умов ЦД 1-го типу.

ВИСНОВКИ. 1. Зменшення інтенсивності MAA- та збільшення WGA- і SNA-лектиноцитохімічного забарвлення мембран мононуклеарних лейкоцитів за умов ЦД 1-го типу може бути пов'язане з пригніченням процесу сіалювання через ($\alpha 2 \rightarrow 3$)-зв'язки або стимулюванням процесу сіалювання термінальних вуглеводних залишків через ($\alpha 2 \rightarrow 6$)-зв'язки.

2. Виявлені зміни у зв'язуванні сіалоспецифічних лектинів WGA, SNA та MAA з глікопротеїнами мембран мононуклеарних лейкоцитів хворих на ЦД 1-го типу можуть свідчити про пригнічення активності Т-лімфоцитів з одночасним підвищенням сенсibiliзації В-лімфоцитів до антигенної стимуляції.

Дослідження були підтримані грантом УНТЦ (Науково-технологічний центр України), 2008-2010 рр.

ЛІТЕРАТУРА

1. Александровский Я.А. Молекулярные механизмы взаимовлияния патологических процессов при совместном протекании сахарного диабета и рака. Научные и клинические аспекты // Биохимия. – 2002. – **67** (12). – С. 1611-1631.
2. Антонюк В.О. Лектини та їх сировинні джерела. – Львів, 2005. – 554 с.
3. Луцик А.Д., Детюк Е.С., Луцик М.Д. Лектины в гистохимии / Под ред. Е.Н. Панасюка. – Львов: Изд-во при ЛГУ, 1989. – С. 5-77.
4. Сибірна Н.О., Барська М.Л., Лаповець Л.Є. Деякі показники клітинного та гуморального імуні-

тету у хворих на цукровий діабет 1-го типу // Лаб. діагностика. – 2003. – № 4. – С. 47-50.

5. Aiba Y., Kameyama M., Yamazaki T. et al. Regulation of B-cell development by BCAP and CD19 through their binding to phosphoinositide 3-kinase // Blood. – 2008. – **111**, № 3. – P. 1497-1503.

6. Arnaiz-Villena A., Timon M., Corell A. Primary immunodeficiency caused by mutations in the gene encoding the $CD3\text{-}\gamma$ subunit of the T lymphocyte receptor // N. Engl. J. Med. – 1992. – № 327. – P. 529-533.

7. Asada M., Furukawa K., Kantor C. et al. Structural study of the sugar chains of human leukocyte cell

adhesion molecules CD11/CD18 // Biochemistry. – 1991. – **30**, № 6. – P. 1561-1571.

8. Chang Y., Chan Y., Jackson D. et al. The glycosaminoglycan-binding domain of decoy receptor 3 is essential for induction of monocyte adhesion // J. Immunol. – 2006. – **176**, № 1. – P. 173-180.

9. Clevers H., Dunlap S., Terhorst C. The transmembrane orientation of the ϵ chain of the TcR/CD3 complex // European J. of Immunology. – 2005. – **18** № 5. – P. 705-710.

10. Fajka-Boja R., Vegi M., Shoenfeld Y. et al. Fermented wheat germ extract induces apoptosis and downregulation of major histocompatibility complex class I proteins in tumor T and B cell lines // International J. of Oncology. – 2002. – **20**. – P. 563-570.

11. Frampton M., Stewart J., Oberdorster G. et al. Inhalation of ultrafine particles alters blood leukocyte expression of adhesion molecules in humans // Environ Health Perspect. – 2006. – № 114. – P. 51-58.

12. Mantovani A., Boldt D.H., Dorsey S.A. Interactions of lectins and monoclonal antibodies with human

mononuclear cells Specific Inhibition of OKT4 and OKT8 Binding by Ricinus communis Agglutinin and Wheat Germ Agglutinin // J of Immunol. – 1983. – **130**, № 4. – P. 1646-1653.

13. Nakata N., Furukawa K., Greenwalt D. et al. Structural study of the sugar chains of CD36 purified from bovine mammary epithelial cells: occurrence of novel hybrid-type sugar chains containing the Neu5Ac alpha 2→6GalNAc beta 1→4GlcNAc and the Man alpha 1→2Man alpha 1→3Man alpha 1→6Man groups // Biochemistry. – 1993. – **32**, № 16. – P. 4369-4383.

14. Soudais C., de Villartay J.P., Le Deist F. et al. Independent mutations of the human CD3- ϵ gene resulting in a T cell receptor/CD3 complex immunodeficiency // Nat. Genet. – 1993. – № 3. – P. 77-81.

15. Tavares S., Stopa E., Robbins S. Differential Distribution of the JC Virus Receptor-Type Sialic Acid in Normal Human Tissues // Am J Pathol. – 2004. – **164**. – P. 419-428.

ЛЕКТИНОЦИТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СИАЛОСОДЕРЖАЩИХ ГЛИКОПРОТЕИНОВ МЕМБРАН МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 1-ГО ТИПА

И.В. Бродяк¹, М.И. Здиорук¹, М.Л. Барская², О.И. Вовк², Н.О. Сибирная¹
ЛЬВОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ИВАНА ФРАНКО¹
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ КЛЕТКИ НАН УКРАИНЫ², ЛЬВОВ

Резюме

Проведено определение общего количества сialiрированных гликоконъюгатов мембран мононуклеарных лейкоцитов крови при сахарном диабете 1-го типа, с использованием лектина зародышей пшеницы. Применение лектина акации амурской и лектина бузины черной позволило дифференцировать разные типы связей (($\alpha 2 \rightarrow 3$) и ($\alpha 2 \rightarrow 6$)) для остатков сialовых кислот в структуре углеводных детерминант гликопротеинов мононуклеарных лейкоцитов периферической крови в норме и при патологии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: мононуклеарные лимфоциты, сialосодержащие гликопротеины, сахарный диабет.

LECTINCYTOCHEMICAL ANALYSIS OF MONONUCLEAR LEUCOCYTES PLASMATIC MEMBRANES SIALIC-CONTAINING GLYCOPROTEIN OF PERIPHERAL BLOOD UNDER TYPE 1 DIABETES MELLITUS

I.V. Brodyak¹, M.I. Zdiuruk¹, M.L. Barska², O.I. Vovk², N.O. Sybirna¹
LVIV NATIONAL UNIVERSITY BY IVAN FRANKO¹
INSTITUTE OF CELL BIOLOGY OF NAS OF UKRAINE²

Summary

The determination of total amount of mononuclear leucocyte membrane sialylated glycoconjugates was carried out under type 1 diabetes mellitus using Wheat germ lectin. The use of Maackia amurensis lectin and Sambucus nigra lectin made it possible to determine different types of bounds (($\alpha 2 \rightarrow 3$) and ($\alpha 2 \rightarrow 6$)) of sialic acids in the carbohydrate determinants of blood mononuclear leucocyte glycoproteins under normal and pathological states.

KEY WORDS: mononuclear leucocytes, sialic acid-containing glycoprotein, diabetes mellitus.

Отримано 15.09.2009 р.

Адреса для листування: І.В. Бродяк, Львівський національний університет імені Івана Франка, вул. М. Грушевського, 4, Львів, 79005, Україна.

ПРО МОЖЛИВІСТЬ ВИКОРИСТАННЯ РІВНЯ ЦИТОКІНІВ У МОНІТОРИНГУ ЗА ВПЛИВОМ НЕОАД'ЮВАНТНОЇ ПОЛІХЕМОТЕРАПІЇ У ХВОРИХ НА РАК ЯЄЧНИКІВ

М.В. Князева, А.В. Прокопюк¹, Т.Д. Павлова²
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ В.Н. КАРАЗІНА
ХАРКІВСЬКИЙ ОБЛАСНИЙ КЛІНІЧНИЙ ОНКОЛОГІЧНИЙ ДИСПАНСЕР¹
ГРОМАДСЬКА ОРГАНІЗАЦІЯ "НОВЕ МИСЛЕННЯ У МЕДИЦИНІ"²

Вивчали зміни рівня цитокінів ІІ-4, ІІ-6, ІІ-1β, TNFα, INFα під впливом неоад'ювантної поліхемотерапії (НПХТ) (1-2, 3-4, 5-6 курсів) у сироватці крові хворих на рак яєчників ІІІ-ІV стадій. Результати порівняння цих даних з клінічною та ультразвуковою картиною захворювання дали підставу запропонувати визначення вмісту комплексу цитокінів для спостереження за ефективністю лікування.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: цитокіни ІІ-4, ІІ-6, ІІ-1β, TNFα, INFα, рак яєчників, неоад'ювантна поліхемотерапія.

ВСТУП. Рак яєчників (РЯ) у більшості випадків розпізнають у ІІІ-ІV стадіях перебігу процесу. Решта хворих на РЯ на першому етапі комбінованого лікування отримує неоад'ювантну поліхемотерапію (НПХТ), що відкриває шляхи до наступної циторедуктивної операції. Оскільки про кількість курсів НПХТ у зв'язку з індивідуалізацією лікування продовжуються дискусії [3], виникає питання про пошук об'єктивних критеріїв моніторингу за перебігом НПХТ. Поряд з УЗД, комп'ютерною томографією, біохімічними дослідженнями глікозаміногліканів (ГАГ) перспективним напрямком для пошуку вважають вивчення цитокінів [1-4]. Важливе значення цитокінових сигналів для функціонування багатьох процесів в організмі людини, наступне вивчення взаємодії цитокінів з клітинами-мішенями, встановлення взаємозв'язку між динамікою їх рівня та клінічними ефектами проведеного лікування сприяють клінічному використанню цитокінів в онкології [1, 2, 4]. Цитокіни відносять до характеристик мікрооточення пухлини, яке змінюється під впливом хемотерапії [1]. Продукція цитокінів супроводжує розвиток не тільки імунної відповіді, але й запальних реакцій, процесів гемопоезу. Решта цитокінів може індукувати продукцію інших, а взаємодія декількох призводить до різних біологічних ефектів. Деякі цитокіни можуть взаємодіяти з клітиною за допомогою одного й того ж рецептора, але при

цьому біологічні відповіді на них будуть відрізнятися. За умов росту пухлини, в тому числі РЯ, встановлено цитокінову дисрегуляцію [4]. Вплив НПХТ на цей процес у динаміці не вивчено. Інші автори досліджують зміни рівня одного цитокіну, що є недостатнім для характеристики пухлинного процесу, реакції організму в динаміці та потребує вивчення комплексу цитокінів, які виконують різні функції [1, 2, 4, 5]. Тому метою даної роботи було вивчити динаміку вмісту комплексу цитокінів (ІІ-4, ІІ-6, ІІ-1β, TNFα, INFα) в сироватці крові хворих на РЯ ІІІ-ІV стадій з підвищенням кількості курсів НПХТ і зіставити отримані результати з клінічною та УЗД-картиною перебігу захворювання.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Вміст цитокінів ІІ-4, ІІ-6, ІІ-1β, TNFα, INFα в сироватці крові обстежених осіб визначали методом ІФА реагентами фірми "Вектор-Бест" (Росія). Було обстежено 60 хворих на РЯ ІІІ-ІV стадій ($T_{3в-с} N_x M_0 - T_{3в-с} N_x M_1$), які на першому етапі комбінованого лікування отримували неоад'ювантну поліхемотерапію за схемою CAP з наступною операцією. 20 хворих одержали 1-2 курси НПХТ, 20 пацієнток – 3-4 курси, 20 хворих – 5-6 курсів. Як контрольні використовували групи з доброякісними пухлинами яєчників (ДПЯ) – 20 хворих із цистоаденомами та 20 здорових жінок відповідного віку. Більшість хворих були віком 50-59 років. Результати піддавали статистичній обробці з використанням критерію Стьюдента.

© М.В. Князева, А.В. Прокопюк, Т.Д. Павлова, 2009.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Дослідження вмісту ІІ-4, ІІ-6, ІІ-1β, TNFα, INFα показало, що розвиток злоякісної пухлини яєчників (РЯ ІІІ-ІV стадій) призвів до підвищення в сироватці крові хворих рівнів ІІ-1β (до $(63,5 \pm 1,5)$ пг/мл), TNFα (до $(3,8 \pm 0,37)$ пг/мл), INFα (до $(22,1 \pm 0,15)$ пг/мл, $p < 0,05$) порівняно з тими ж показниками крові у пацієнток з ДПЯ ($(32,3 \pm 1,3)$; $(1,2 \pm 0,22)$; $(18,45 \pm 0,25)$ пг/мл відповідно) й зниження рівня ІІ-6 (до $(44,0 \pm 1,5)$ від $(138,0 \pm 3,1)$ пг/мл) на тлі незміненого вмісту ІІ-4 ($(7,2 \pm 0,57)$ пг/мл). Використання 1-2 курсів НПХТ спричинило зростання рівня всіх досліджених цитокінів, а 3-4 – збільшення вмісту ІІ-4 (до $(26,8 \pm 0,8)$ пг/мл, $p < 0,05$), ІІ-1β (до $(241,0 \pm 2,5)$ пг/мл, $p < 0,05$), TNFα (до $(17,0 \pm 0,55)$ пг/мл, $p < 0,05$), зниження рівня ІІ-6 (до $(5,0 \pm 0,37)$ пг/мл порівняно з $(58,0 \pm 1,8)$ пг/мл після 1-2 курсів НПХТ) і INFα (до $(11,2 \pm 0,51)$ пг/мл порівняно з $(48,5 \pm 0,85)$ пг/мл після 1-2 курсів НПХТ, $p < 0,05$). НПХТ у кількості 5-6 курсів призвела до зменшення всіх вивчених нами цитокінів, за винятком ІІ-6 ($(4,0 \pm 0,25)$ пг/мл), вміст якого не змінювався порівняно з попереднім впливом НПХТ. Слід зазначити, що після 5-6 курсів НПХТ ІІ-4 ($(5,5 \pm 0,31)$ пг/мл) і ІІ-1β ($(30,5 \pm 1,8)$ пг/мл) сягали значень, характерних для ДПЯ, а INFα ($(12,0 \pm 0,5)$ пг/мл) і ІІ-6 ($(4,0 \pm 0,25)$ пг/мл) знижувались. Було встановлено, що TNFα майже в 4 рази вищий, ніж у хворих з ДПЯ, що, вочевидь, може бути пов'язано з розвитком неоангіогенезу у хворих на РЯ, оскільки одним із джерел цього цитокіну є клітини ендотелію судин. Оскільки у хворих на РЯ відбувається гальмування Т-ланки імунітету, головним джерелом збільшення цього цитокіну можуть бути не Т-лімфоцити, а стимульовані мононуклеарні фагоцити, небезпечні клітини, що активуються у зв'язку з розвитком запальної реакції на інвазію пухлини через тканинні бар'єри. Підвищення вмісту даного цитокіну в 7 разів після 1-2 курсів НПХТ порівняно з вмістом у хворих з ДПЯ, можливо, пов'язане зі стимуляцією механізмів апоптозу пухлинних клітин препаратами, що належать до схеми CAP НПХТ. Відомо, що ІІ-1β є лідером серед цитокінів запалення, бере участь у катаболічних запальних реакціях. Разом із тим, цей цитокін впливає на імунорегуляторні процеси, посилює проліферацію CD4⁺-клітин, ріст і диференціацію В-клітин, сприяє активації продукування антитіл, діє на мононуклеарні фагоцити і клітини васкулярного ендотелію, стимулює подальше продукування ними ІІ-4, ІІ-6, ІІ-3,5,7,10,12. Даний цитокін можуть продукувати пухлинні клітини, у зв'язку з чим вважа-

ють, що його продукування сприяє їх проліферації [1]. У людини підвищену продукцію ІІ-1β спостерігають при гемобластозах, РЯ та ін. ІІ-1β при цих захворюваннях сприяє продукуванню ІІ-6, що, у свою чергу, стимулює пухлинну проліферацію з індукцією TNFα, ІІ-12, а також виникнення радикалів кисню. Гальмування росту більшості клітин під впливом INFα зумовлене його цитотоксичною дією. Його зворотна блокуюча дія на диференціювання нормальних і пухлинних клітин є дозозалежною: високі дози блокують цей процес, низькі – активують. Показником протипухлинної активності INFα є гальмування проліферації клітин, але ж антипластичні його ефекти можуть зумовлюватися іншими механізмами: можливістю цитокінів модулювати імунну реакцію організму власника, можливістю впливати на диференціювання клітин, підвищення імуногенності пухлини або модуляцію пухлинними клітинами експресії онкогенів. Є інформація про індукцію INFα апоптозу в пухлинних клітинах. Як і TNFα, ІІ-1β, ІІ-6, інтерферони належать до протизапальних цитокінів. Підвищення їх рівнів після 1-2 курсів НПХТ, що посилюється після 3-4 курсів, може свідчити про посилення в організмі запальних процесів. Збільшення при цьому антизапального цитокіну ІІ-4 в 1,5 раза після 1-2 курсів НПХТ, в 3,5 раза після 3-4 курсів набуває, вочевидь, компенсаторного характеру, що оберігає організм від надмірної за амплітудою запальної реакції на препарати НПХТ. У даному випадку відбуваються модуляція локальних і системних механізмів захисту, узгодження дій імунної, ендокринної та нервової систем [1, 2].

Слід зазначити, що підвищення всіх досліджених нами цитокінів після 1-2 курсів НПХТ супроводжувалось клінічно і за даними УЗД [3] зменшенням розмірів пухлинного конгломерату і метастазів у ректопіхвовій перегородці (на 10-15 %), розмірів підкапсульних метастазів у печінці й лімфовузлах поза очеревиною (на 10-20 %), значним зменшенням об'єму (або зникненням) асцитичної рідини. Після 3-4 курсів НПХТ при ще більшому підвищенні ІІ-4, ІІ-1β, TNFα, зниженні ІІ-6 і INFα значно зменшились розміри пухлини і метастазів. Зниження вмісту всіх цитокінів (крім ІІ-6) після 5-6 курсів НПХТ до рівня контрольних значень супроводжувалося тією ж тенденцією до змін клінічної картини захворювання і даних УЗД.

ВИСНОВОК. Динаміка вмісту комплексу цитокінів ІІ-4, ІІ-6, ІІ-1β, TNFα, INFα в сироватці крові хворих на РЯ ІІІ-ІV стадій у процесі про-

ведення НПХТ відповідає характеру гальмування пухлинного процесу за даними клінічних спостережень, УЗД і КТ, що може бути підставою для використання змін рівня об-

раних цитокінів як додаткового критерію в прогнозуванні операбельності хворих на РЯ розповсюджених форм після різної кількості курсів НПХТ та індивідуалізації лікування.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бережная Н.М. Роль клеток системы иммунитета в микроокружении опухоли. I. Клетки и цитокины – участники воспаления // Онкология. – 2009. – **11**, № 1. – С. 6-17.
2. Ломницька М.І., Володько Н.А., Соломко Б.І., Білинський Б.Т. Вплив хіміотерапевтичного лікування на ангіогенез раку яєчників // Здоровье женщины. – 2005. – № 2, часть 2. – С. 55-57.
3. Прокопюк А.В., Сухіна О.М., Міхановський А.А. та ін. Ультразвукові особливості поширених форм раку яєчників у процесі неoad'ювантної поліхіміотерапії // Эксперим. і клін. медицина. – 2008. – № 2. – С. 143-146.
4. Телетаева Г.М. Цитокины и противоопухолевый иммунитет // Практическая онкология. – 2007. – **8**, № 4. – С. 211-218.
5. Knyazyeva M., Fedec O., Prokopyuk A., Pavlova T. Changes in some cytokines and glycosaminoglycan content in patients having ovarian cancer (in the course of treatment) // FEBS Journal. – 2008. – **275**. – P. 237.

ОБ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ УРОВНЯ ЦИТОКИНОВ В МОНИТОРИНГЕ ЗА ВЛИЯНИЕМ НЕОАДЪЮВАНТНОЙ ПОЛИХИМИОТЕРАПИИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЯИЧНИКОВ

М.В. Князева, А.В. Прокопюк¹, Т.Д. Павлова²

ХАРЬКОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ В.Н. КАРАЗИНА
ХАРЬКОВСКИЙ ОБЛАСТНОЙ КЛИНИЧЕСКИЙ ОНКОЛОГИЧЕСКИЙ ДИСПАНСЕР¹
ОБЩЕСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ "НОВОЕ МЫШЛЕНИЕ В МЕДИЦИНЕ"²

Резюме

Изучали изменения уровня цитокинов II-4, II-6, II-1 β , TNF α , INF α под влиянием неoad'ювантной полихимиотерапии (НПХТ) (1-2, 3-4, 5-6 курсов) в сыворотке крови больных раком яичников III-IV стадий. Результаты сравнения этих данных с клинической и ультразвуковой картиной заболевания дали основание предложить определение содержания комплекса цитокинов для наблюдения за эффективностью лечения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: цитокины II-4, II-6, II-1 β , TNF α , INF α , рак яичников, неoad'ювантная полихимиотерапия.

ABOUT POSSIBILITY OF CYTOKINE LEVEL USING FOR EFFECT OF NEOADJUVANT PROCESS MONITORING AT PATIENTS WITH OVARIAN CANCER

M.V. Knyazyeva, A.V. Prokopyuk, T.D. Pavlova

KHARKIV NATIONAL UNIVERSITY BY V.N. KARAZIN
KHARKOV REGIONAL CLINICAL ONCOLOGY DISPENSARY¹
PUBLIC ORGANIZATION "NEW THINKING IN MEDICINE"²

Summary

There were studied cytokines II-4, II-6, II-1 β , TNF α , INF α level changes in blood serum under neoadjuvant polychemotherapy (1-2, 3-4, 5-6 courses) influence at patients having ovarian cancer of III-IV stages. The results of data comparison with clinical and ultrasound pictures of disease gave basis to propose the cytokine level determination for treatment effect monitoring.

KEY WORDS: cytokines II-4, II-6, II-1 β , TNF α , INF α , ovarian cancer, neoadjuvant polychemotherapy.

Отримано 24.09.2009 р.

Адреса для листування: М.В. Князева, Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, 61077, Україна.

ГІПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМІЯ ЯК ОДИН ІЗ НАСЛІДКІВ ВІРУСНО-БАКТЕРІАЛЬНОЇ ІНФЕКЦІЇ У ДІТЕЙ

І.І. Торяник, Н.Г. Попова

ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ ТА ІМУНОЛОГІЇ ІМЕНІ І.І. МЕЧНИКОВА АМН УКРАЇНИ, ХАРКІВ

У статті проаналізовано динаміку рівня холестерину в сироватці крові дітей зі змішаною вірусно-бактеріальною інфекцією (вірус простого герпесу та мікоплазма людини). Зроблено спроби визначити залежність вмісту холестерину від типу захворювання (моно-, мікст-інфекція), його характеру, тяжкості перебігу. Наведено причини виникнення інфекційної гіперхолестеринемії у сироватці крові хворих дітей.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: гіперхолестеринемія, вірусно-бактеріальна інфекція, герпетична моноінфекція, мікоплазмоз, діти.

ВСТУП. Ліпідний спектр сироватки крові надто чутливий до різних впливів (у тому числі інфекційних) і насправді вважається “дзеркалом” функціонального стану організму в цілому [1, 6, 8, 9]. Зміни у ліпідному складі сироватки відображають компенсаторні та захисні реакції, глибину уражень та швидкість усіх відновних процесів у системі. Ранньою реакцією на вплив інфекційних агентів (вірусної, бактеріальної, паразитарної природи) є підвищення рівня холестерину в сироватці крові [3]. Вищезгадана реакція має фазний характер та залежить від етіопатогенетичних факторів захворювання, його стадії, тривалості, особливостей перебігу.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Матеріалом дослідження стали проби сироватки крові дітей від 0 до 3-х років (n=42), хворих на мікоплазмоз, герпетичну моно- та змішану вірусно-бактеріальну інфекції, які перебували на стаціонарному лікуванні в Харківській дитячій інфекційній лікарні № NN. Контрольну групу (1-шу) складали здорові респонденти, яких обстежували за згодою батьків у межах поточного медичного огляду. До груп клінічного порівняння відносили малюків із лабораторно встановленою та клініко-анамнестично підтвердженою герпетичною (2-га) та мікоплазмозом (3-тя) моноінфекціями. З метою визначення глибини та зворотності змін, швидкості відновних процесів в організмі дітей із встановленою вірусно-бактеріальною інфекцією – 4-та група (вірус простого герпесу – ВПГ, мікоплазма людини – МЛ) досліджували динаміку рівня холестерину (Хс) у сироватці крові

in vitro. Забір крові з vena subitalis здійснювали, строго дотримуючись вимог до лабораторних досліджень зазначеної категорії (накази МОЗ України № 38 від 05.03.1993; № 1904-04/23 від 10.07.2000), у порівняльному аспекті в ранкові години доби натщесерце [4]. Ідентифікували маркери ВПГ-інфекції (антитіл Ig G, Ig M) методом імуноферментного аналізу із застосуванням діагностичних тест-систем “ВектоВПГ-IgG-стрип”, “ВектоВПГ-IgM-стрип” ЗАТ “Вектор-Бест” (Кольцово, Росія). Для виявлення Ig G до *Mycoplasma hominis* використовували тест-систему “МікоплазмаБест-Ig G”. Рівень холестерину встановлювали за допомогою набору ферментних тест-систем. Тестування здійснювали на фотометрі імуноферментному Stat Fax 303 Plus. Для встановлення маркерів (ВПГ, МЛ) визначали кількісні показники оптичної щільності дослідних і контрольних зразків (позитивного і негативного) згідно з інструкцією до тест-систем [5]. Статистичну обробку експериментальних даних проводили відповідно до правил рядової та альтернативної варіаційної статистики [2].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. У результаті дослідження було встановлено, що рівень Хс у сироватці крові дітей, які складали контрольну групу, не перевищував вікової норми (1,37-3,50 ммоль/л – новонароджені; 1,81-4,53 ммоль/л – діти до 1 року; 3,11-5,18 ммоль/л – діти віком до 3-х років за У. Тиц, 1986 [4]) і становив, відповідно, 2,44-4,15 ммоль/л (рис. 1). Зазначеній стратегії відповідали показники функціональних проб, призначених з метою об’єктивізації клінічної картини та обов’язкових за умов перебування хворої дитини в стаціонарі. Інша ситуація склалась у дітей зі зміша-

ною вірусно-бактеріальною інфекцією, в яких показники рівня Хс у сироватці крові виявились найвищими та досягали 5,15-6,10 ммоль/л. Проміжною позицією характеризувались результати, отримані в разі обстеження пацієнтів із встановленими герпесвірусною (ВПГ) та мікоплазмозомою інфекціями (МЛ). У першому випадку (ВПГ) рівень Хс у сироватці крові перевищував відповідні (3,95-5,35 ммоль/л) показники у хворих з мікоплазмозами (МЛ) і становив 4,10-

5,65 ммоль/л. Проте проби, отримані від пацієнтів як 2-ї, так і 3-ї груп, кількісно все ж не досягли рівня Хс, що спостерігався в обстежених із змішаною вірусно-бактеріальною інфекцією.

Інфекційна гіперхолестеринемія у сироватці крові мала адаптивний характер та була пов'язана з активізацією холестериногенезу. Ця реакція – загальна функціональна відповідь клітин на пошкодження та подальше відновлення їх мембран [3].

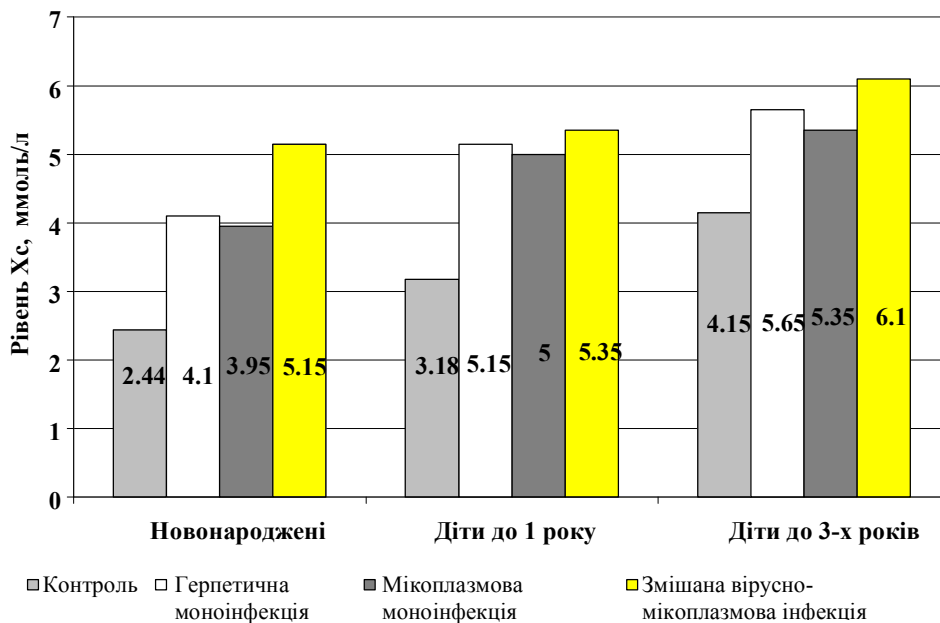


Рис. 1. Вміст холестерину в сироватці крові дітей контрольної і клінічної груп.

Пролонгована дія інфекційного агента на клітини мала потенціовальний вплив на зміни у динаміці рівня Хс. Проте саме з нею були пов'язані наступна поступова адаптація та низка важливих обмінних процесів: стимуляція синтезу Хс у печінці зі збільшенням швидкості його транспорту в кров; затримка Хс у кровоносному руслі через функціональні пошкодження печінки (гігантоклітинний метаморфоз, гіперхроматоз, альтерація гепатоцитів, вакуолізація цитоплазми); зменшення швидкості утилізації ліпопротеїдів в екстрапечінкових тканинах (дегенеративно-деструктивні зміни у нефротелії, ентероцитах, мезотелії, панкреатоцитах).

Важко сказати, який саме з вищезгаданих процесів робить вирішальний внесок у розвиток інфекційної гіперхолестеринемії в сироватці крові дітей з вірусно-бактеріальною інфекцією [10, 12]. Проте атерогенна ситуація у крові, коли репаративні потреби у Хс не значні, навряд чи змогла б позитивно вплинути на функціональний стан систем організму. Додаткова інфекційна стимуляція у вигляді бактеріальних агентів призводила на певний

час до помітного підвищення рівня Хс. Останній фактор стимулював більш глибокі структурно-функціональні зміни порівняно з моноінфекцією [7, 11]. Запуск та реалізація постінфекційних процесів потребували значного функціонального напруження систем організму, в тому числі печінки. Очевидно, застосування на цьому тлі антивірусних та антибактеріальних лікарських засобів, поза призначенням гепатопротекторів і стабілізаторів ліпідного обміну, сприятиме переходу процесу гіперфункції клітин у стадію виснаження та функціональної нестачі. Ось чому окремі дослідники [1, 4, 9] втрату Хс та пригнічення його синтезу інтерпретують як ранні прояви летальних незворотних порушень життєдіяльності клітин.

ВИСНОВКИ. Гіперхолестеринемія була одним із наслідків розвитку інфекційного процесу в дітей віком від 0 до 3-х років. Найвищого рівня вона досягала у групі хворих зі змішаною вірусно-бактеріальною інфекцією (ВПГ та МЛ). Розвиток гіперхолестеринемії пов'язаний із стимуляцією синтезу Хс у печінці зі збільшенням швид-

кості його транспорту в кров; затримкою Хс у кровеносному руслі через функціональні пошкодження печінки (гігантоклітинний метаморфоз, гіперхроматоз, альтерація гепатоцитів, вакуолі-

зація цитоплазми); зменшенням швидкості утилізації ліпопротеїдів в екстрапечінкових тканинах (дегенеративно-деструктивні зміни у нефроцитах, еритроцитах, мезотелії, панкреатоцитах).

ЛІТЕРАТУРА

1. Гулько В.В. Влияние гамма-облучения на спектр липопротеидов в крови крыс // Весці АН Беларусі. – 1992. – № 3-4. – С. 41.
2. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.
3. Липовецкий Б.М., Константинов В.О. Холестерин крови и сердце человека. – СПб.: Наука, 1993. – С. 23-31; 74-89.
4. Назаренко Г.И., Кишкун А.А. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований. – 2-е изд., стереотипное. – М.: Медицина, 2002. – С.14-38.
5. Основні принципи діагностики та лікування інфекцій, викликаних α -герпесвірусами І-III типів: Методичні рекомендації. – Київ–Львів–Сімферополь, 2004. – 28 с.
6. Панасюк Е.Л. Смешанные вирусно-бактериальные инфекции: особенности клиники, лечения // Сучасні інфекції. – 2007. – № 2. – С. 44-50.
7. Раковская И.В., Горина Л.Г. Лабораторная диагностика микоплазмозов человека // Клин. лаб. диагностика. – 2000. – № 8. – С. 50-53.
8. Редькин Ю.В., Мирошник О.А., Лобов В.В. Оппортунистические инфекции: проблемы и перспективы. – Омск: ОМА, 2002. – 100 с.
9. Сараев Ю.В., Детинкин К.А. Фосфолипидный состав ЛПВП при экспериментальном радиационном поражении // В сб. Витебского мед. ин-та МЗ БССР. – 1992. – № 3-4. – С. 6.
10. Freedman E., Mindel A., Jones C. Epidemiological, clinical and laboratory aids for the diagnosis of neonatal herpes – an Australian perspective // Herpes. – 2004. – 11, № 2. – P. 38-40.
11. Stanberry L.R. Prevention strategies for HSV-2 // Herpes: Abstracts from the 13th Annual Meeting of the IHMF. – Prague, Czech Republic, 2006. – Suppl. 2. – P. 48A.
12. Weiss H. Epidemiology of herpes simplex virus type 2 infection in the developing world // Herpes. – 2004. – 11, suppl. 1. – P. 24A-35A.

ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМИЯ КАК ОДНО ИЗ ПОСЛЕДСТВИЙ ВИРУСНО-БАКТЕРИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ

И.И. Торяник, Н.Г. Попова

ИНСТИТУТ МИКРОБИОЛОГИИ И ИММУНОЛОГИИ ИМЕНИ И.И. МЕЧНИКОВА АМН УКРАИНЫ, ХАРЬКОВ

Резюме

В статье проанализирована динамика уровня холестерина в сыворотке крови детей со смешанной вирусно-бактериальной инфекцией (вирус простого герпеса и микоплазма человека). Предприняты попытки определить зависимость содержания холестерина от типа заболевания (моно-, микст-инфекция), его характера, тяжести течения. Приведены причины развития инфекционной гиперхолестеринемии в сыворотке крови больных детей.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гиперхолестеринемия, вирусно-бактериальная инфекция, герпетическая моноинфекция, микоплазмоз, дети.

HYPERCHOLESTEROLEMIA AS ONE OF AFTER-EFFECTS OF VIRAL-BACTERIAL INFECTION IN CHILDREN

I.I. Torianyk, N.H. Popova

INSTITUTE OF MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY BY I.I. MECHNYKOV OF UKRAINIAN AMS OF UKRAINE, KHARKIV

Summary

The level dynamics of cholesterol in blood serum of children with mixed viral-bacterial infection (herpes simplex virus and mycoplasma hominis) is analyzed in the article. The attempts are undertaken to determine the dependence of the cholesterol content on a disease type (mono-, mixt-infection), its character and disease severity. The causes of hypercholesterolemia development in blood serum of patients are discussed.

KEY WORDS: hypercholesterolemia, viral-bacterial infection, herpetic mono-infection, mycoplasmosis, children.

Отримано 7.09.2009 р.

Адреса для листування: І.І. Торяник, вул. Камишева, 39, кв. 9, Харків, 61038, Україна.

ВПЛИВ ЛАКТАТУ ЛІТІО НА ГЕМОЛІЗ ЕРИТРОЦИТІВ**О.П. Шатова, Є.В. Хомутов, Т.О. Журавель, О.В. Богатирьова, З.М. Скоробогатова, І.І. Зінкович***ДОНЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ М. ГОРЬКОГО*

Довгий час лактат розглядали як тупік метаболізму і головну причину пошкодження тканин. Продукція лактату впливає на концентрацію таких гліколітичних метаболітів, як фруктозо-6-фосфат, фруктозо-1,6-біфосфат, фосфоенолпіруват. Лактат регулює активність алостеричного ферменту гліколізу – фосфофруктокінази (ФФК). Примітно, що інгібування ФФК шляхом дисоціації субодиниць відбувається при рН 7,4. Нами отримані дані про дозозалежний вплив лактату літію на деструкцію еритроцитів. В експерименті гемоліз був зумовлений не ацидозом, тому що рН при додаванні лактату літію залишався в межах 7,4, а регуляторним впливом аніона лактату.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: лактат літію, еритроцит, лактатдегідрогеназа.

ВСТУП. В еритроцитах катаболізм глюкози забезпечує збереження структури і функції гемоглобіну, цілісність мембрани й утворення енергії для іонних насосів. Глюкоза надходить в еритроцити шляхом полегшеної дифузії за допомогою ГЛЮТ-1 [7]. Приблизно 90 % глюкози використовується в гліколізі, а 10 % – у пентозно-фосфатному шляху. Важлива особливість гліколізу в еритроцитах – присутність в них ферменту біфосфогліцератмутази (утворює 2,3-біфосфогліцерат з 1,3-біфосфогліцерату). 2,3-біфосфогліцерат є важливим алостеричним регулятором зв'язування кисню гемоглобіном. При гіпоксії компенсаторно збільшується рівень 2,3-біфосфогліцерату.

Єдиним джерелом АТФ в еритроциті є анаеробний гліколіз. Регуляція активності гліколізу й, відповідно, утворення лактату в еритроцитах здійснюється інсуліном шляхом фосфорилування фосфофруктокінази (ФФК). Збільшуючи утворення АТФ і НАДН, інсулін перешкоджає гемолізу [9]. Гліколіз та пентозо-фосфатний шлях в еритроцитах є постачальниками НАДН і НАДФН, які відновлюють метгемоглобін [8]. Такий спосіб окиснювання глюкози в еритроциті має дві функції: енергетичну й антиоксидантну. Інгібування гліколізу призводить до порушення цих функцій і, відповідно, до гемолізу.

За даними Young [6], порушення ресинтезу аденозинтрифосфорної кислоти або інших фосфорних сполук, які необхідні для підтримки нормальної форми еритроцитів,

може призвести до зміни форми еритроцита на сфероподібну й, відповідно, до підвищеного гемолізу. При наявності 50 % вихідної кількості АТФ еритроцити зберігають форму диска, але при зменшенні рівня АТФ нижче 10 % від нормального еритроцити втрачають іони калію і відбувається їх сферуляція.

Згідно з даними сучасних авторів, мембрана еритроцитів містить актоміозиноподібні білки [4, 5], що виконують контрактильну функцію і володіють аденозинтрифосфатазною активністю.

Можна виділити чотири основних фактори, які призводять до порушення бар'єрних властивостей мембран при патологічних станах: перекисне окиснення ліпідів, активація ендогенних фосфоліпаз, механічне (осмотичне) розтягування мембран, адсорбція на ліпідному шарі поліелектролітів, включаючи поліпептиди й білки.

Метою нашої роботи була оцінка впливу лактату на гемоліз еритроцитів.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Модельні експерименти з вивчення впливу лактату на гемоліз еритроцитів проводили в 10 пробах крові. З 2 мл гепаринізованої крові одержували еритроцитарну масу, потім еритроцити двічі відмивали у фізіологічному розчині NaCl. Суспензію еритроцитів готували у фосфатному буфері (рН 7,4), а потім розділяли на чотири пробірки: перша пробірка – контрольна, без лактату, а інші – з різною концентрацією лактату літію (друга – 7,5 мМ/л, третя – 10 мМ/л, четверта – 15 мМ/л). Після додавання лактату літію проводили контроль рН. Потім отриману суміш інку-

© О.П. Шатова, Є.В. Хомутов, Т.О. Журавель, О.В. Богатирьова, З.М. Скоробогатова, І.І. Зінкович, 2009.

бували 60 хв при 37 °С та періодичному “м’якому” помішуванні. Після інкубації визначали рН. Всі пробірки центрифугували при 3000 об./хв протягом 30 хв. З метою визначення гемолізу еритроцитів встановлювали показник деструкції клітин – активність лактатдегідрогенази (ЛДГ) в інкубаційному середовищі. Активність ЛДГ вимірювали спектрофотометрично за зміною в пробі рівня відновленого НАД з використанням комерційного набору LDH-50 (Pliva-Lachema). Білок в інкубаційному середовищі визначали за методом Лоурі [2].

Статистичну обробку результатів проведено за допомогою пакета STATISTICA-6,0 [1]. Цифрові дані в тексті й таблицях представлено у вигляді середніх арифметичних та стандартних помилок. Розходження між значеннями показників вважали достовірними при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Активність ЛДГ в інкубаційному середовищі вірогідно підвищувалась при інкубації з лактатом літію, примітно, що зі збільшенням концентрації лактату зростала й активність ЛДГ (рис. 1). У контрольній пробі активність ЛДГ становила $(0,7 \pm 0,08)$ мккат/л. У пробі з концентрацією лактату літію 7,5 мМ каталітична активність ЛДГ була в 2,7 раза вищою, ніж у контролі, й складала $(1,9 \pm 0,05)$ мккат/л. При концентрації лактату літію в пробі 10 мМ активність ферменту збільшувалася до $(2,5 \pm 0,1)$ мккат/л, а при 15 мМ – до $(3,3 \pm 0,14)$ мккат/л. При концентрації лактату літію в пробі 15 мМ/л активність ЛДГ була в 4,7 раза вищою порівняно з контролем. Спостерігали дозозалежний ефект між концентрацією лактату та деструкцією еритроцитів.

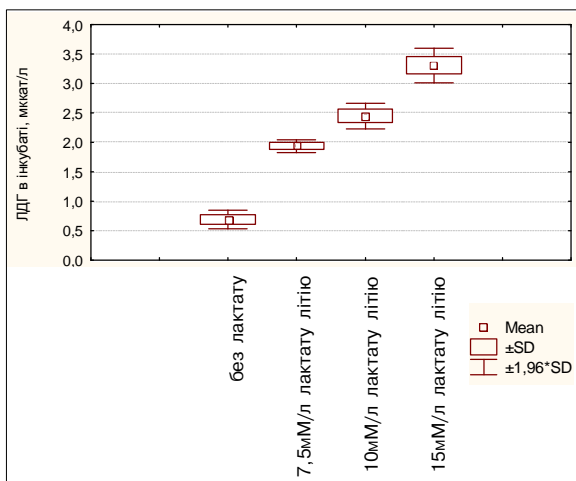


Рис. 1. Вплив різних концентрацій лактату літію на деструкцію еритроцитів.

Виявлені ефекти лактату не пов’язані зі зміною рН – на всіх етапах експерименту концентрація протонів не змінювалася (рН 7,4).

Підвищення активності ЛДГ зумовлене пошкодженням мембран і виходом в інкубат внутрішньоклітинних білків. Однак ступінь приросту білка в інкубаційному середовищі був значно меншим, ніж показаний ступінь зростання активності ЛДГ. У пробі з 7,5 мМ лактату літію рівень білка збільшувався всього на 6 % (53 г/л порівняно з 50 г/л у контрольних пробах), а при концентрації лактату літію 15 мМ – усього на 20 % (60 г/л).

Цікаво, що білок при концентрації лактату літію 15 мМ збільшувався в інкубаційному середовищі всього на 20 % порівняно з контролем, а каталітична активність ЛДГ підвищувалася на 470 % (рис. 2).

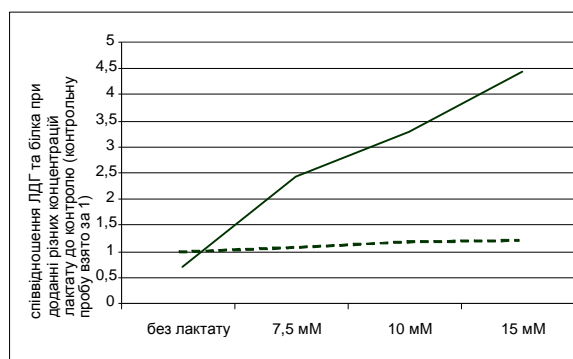


Рис. 2. Нормовані до контрольних значень показники активності ЛДГ (суцільна лінія) і рівня білка (пунктирна лінія) у пробах з різними концентраціями лактату.

Значення рН було стабільним (7,4) після додання лактату літію, тому гемоліз зумовлений не впливом ацидозу, а безпосереднім впливом аніонів лактату. У якості одного з механізмів такого впливу можна припустити, що відповідно до градієнта концентрацій лактат літію проникає в еритроцити й інгібує регуляторний фермент гліколізу – фосфофруктокіназу [3]. Зменшення активності цього ферменту, який є алостеричним, призводило до інгібування гліколітичного окиснювання глюкози й до гіпоенергетичного стану. Можливо, інгібування гліколізу пов’язане зі збільшенням відновленого НАД. Зниження концентрації АТФ в еритроциті зумовлювало порушення роботи АТФ-залежних каналів, що може бути однією з причин осмотичного гемолізу.

ВИСНОВКИ. Деструкція еритроцитів, зумовлена лактатом літію, залежить від його концентрації в інкубаційному середовищі. Лактат літію, не змінюючи рН, інгібує активність ферментів гліколізу в еритроцитах, що призводить до гіпоенергетичного стану і, як наслідок, до осмотичного гемолізу, показником якого є збільшення активності ЛДГ і білка в інкубаційному середовищі.

ЛІТЕРАТУРА

1. Шатова О.П., Борзенко Б.Г., Хилько Д.А. и др. Активность лактатдегидрогеназы при раке молочной железы // Питання експериментальної та клінічної медицини. – 2008. – № 12. – С. 197-203.
2. Borzenko B.G., Bakurova E.M. Disturbed metabolism of gastric mucosa DNA precursors as prognosticator of neoplastic transformation of gastric ulcer // Vopr. Oncol. – 2008. – № 54. – P. 184-187.
3. Carotenuto R., Petrucci T.C., Correias I. et al. Protein 4.1 and its interaction with other cytoskeletal proteins in *Xenopus laevis* oogenesis // Eur. J. Cell Biol. – 2009. – № 88. – P. 343-356.
4. Costa L.T., Da S.D., Guimaraes C.R. et al. Lactate favours the dissociation of skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase tetramers down-regulating the enzyme and muscle glycolysis // Biochem. J. – 2007. – № 408. – P. 123-130.
5. Kalfa T.A., Pushkaran S., Mohandas N., Rac GTPases regulate the morphology and deformability of the erythrocyte cytoskeleton // Blood. – 2006. – № 108. – P. 3637-3645.
6. Reed C.F., Young L.E. Erythrocyte energy metabolism in hereditary spherocytosis // J. Clin. Invest. – 1967. – № 46. – P. 1196-1204.
7. Schroeder R.E., Doria-Medina C.L., Das U.G. et al. Effect of maternal diabetes upon fetal rat myocardial and skeletal muscle glucose transporters // Pediatr. Res. – 1997. – № 41. – P. 11-19.
8. Siems W.G., Sommerburg O., Grune T. Erythrocyte free radical and energy metabolism // Clin. Nephrol. – 2000. – № 53. – P. 9-17.
9. Zancan P., Sola-Penna M. Regulation of human erythrocyte metabolism by insulin: cellular distribution of 6-phosphofructo-1-kinase and its implication for red blood cell function // Mol. Genet. Metab. – 2005. – № 86. – P. 401-411.

ВЛИЯНИЕ ЛАКТАТА ЛИТИЯ НА ГЕМОЛИЗ ЭРИТРОЦИТОВ

О.П. Шатова, Е.В. Хомутов, Т.А. Журавель, Е.В. Богатырева, З.М. Скоробогатова, И.И. Зинкович

ДОНЕЦКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ М. ГОРЬКОГО

Резюме

Долгое время лактат рассматривали как тупик метаболизма и главную причину повреждения тканей. Продукция лактата влияет на концентрацию таких гликолитических метаболитов, как фруктозо-6-фосфат, фруктозо-1,6-бисфосфат, фосфоэнолпируват. Лактат регулирует активность аллостерического фермента гликолиза – фосфофруктокиназы (ФФК). Примечательно, что ингибирование ФФК путем диссоциации субъединиц происходит при pH 7,4. Нами получены данные о дозозависимом влиянии лактата лития на деструкцию эритроцитов. В эксперименте гемолиз был обусловлен не ацидозом, так как pH при добавлении лактата лития оставался в пределах 7,4, а регуляторным влиянием аниона лактата.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: лактат лития, эритроцит, лактатдегидрогеназа.

IMPACT OF LITHIUM LACTATE ON HEMOLYSIS OF RED BLOOD CELLS

O.P. Shatova, Ye.V. Khomutov, T.O. Zhuravel, O.V. Bohatyryova, Z.M. Skorobohatova, I.I. Zinkovych

DONETSK NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY BY M.H. HORKY

Summary

For a long time lactate has been considered as the metabolism dead-end as well as the major cause of the tissues damage. Lactate production have an impact on concentration of such glycolytic metabolites as fructose-6-phosphate, fructose-1,6-biphosphate, phosphoenolpyruvate. Lactate regulates the activity of allosteric regulatory enzyme of glycolysis – phosphofructokinase (PFK). Inhibition of PFK by subunits dissociation occurs under pH 7,4. Our studies demonstrate the dose-dependent impact of lithium lactate on destruction of red blood cells. Experimental hemolysis did not appear due to acidosis because pH after addition lactate lithium was 7,4. It was regulatory effect of lactate anion only.

KEY WORDS: lactate, red blood cell, lactate dehydrogenase.

Отримано 11.09.2009 р.

Адреса для листування: О.П. Шатова, Донецький національний медичний університет імені М. Горького, просп. Ілліча, 16, Донецьк, 83003, Україна.

КОНЦЕНТРАЦІЯ ФАКТОРА НЕКРОЗУ ПУХЛИН АЛЬФА В СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ З ТРИВАЛОЮ ГІПОАЦИДНІСТЮ ЗА УМОВ ВВЕДЕННЯ МУЛЬТИПРОБІОТИКІВ

О.Г. Короткий, Т.П. Карповець, С.В. Пилипенко, Т.В. Берегова, Л.І. Остапченко
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

Встановлено значне підвищення концентрації фактора некрозу пухлин альфа в сироватці крові щурів з тривалим гіпоацидним станом, який був викликаний введенням "Омезу®" протягом 28 днів. Показано, що одночасне введення "Омезу®" та мультипробіотиків "Симбітер® ацидофільний концентрований" і "Апі-бакт®" призвело до значного зменшення концентрації досліджуваного фактора в сироватці крові щурів порівняно з введенням лише "Омезу®".

КЛЮЧОВІ СЛОВА: гіпоацидність, мультипробіотик, фактор некрозу пухлин альфа.

ВСТУП. Відомо, що мікрофлора шлунково-кишкового тракту виконує імуномодулюючу функцію на різних рівнях імунного захисту: підтримує імунний гомеостаз, активно взаємодіючи з клітинами імунної системи травного тракту, визначає їх диференціацію, впливає на баланс в системі Th1/Th2 та синтез імунними клітинами багатьох цитокінів [3, 10]. За умов тривалої гіпоацидності є доцільними профілактика та лікування дисбактеріозів пробіотиками.

Окрім негативного впливу на мікробіоценоз травного тракту, тривале зниження кислотності шлункового соку (наприклад інгібітором протонної помпи – омепразолом) призводить до морфофункціональних змін у шлунково-кишковому тракті та значного підвищення рівня гастрину в крові (гіпергастринемії) [1, 9]. Встановлено, що гіпергастринемія є фактором ризику розвитку пухлин шлунка і товстої кишки [8, 12].

Відомо, що при гіпергастринемії стимулюється синтез гена фактора некрозу пухлин альфа (ФНП- α) в лімфоцитах, які інфільтрують травний тракт [14]. ФНП- α , крім того, що відіграє одну з провідних ролей у розвитку запальних процесів і протипухлинному імунитеті [2, 5], посилює синтез гастрину G-клітинами шлунка [7, 13]. Проте роль ФНП- α у механізмах розвитку гіпергастринемії за умов тривалого зниження секреції соляної кислоти в шлунку та при введенні мультипробіотиків залишається нез'ясованою.

Метою роботи було визначити концентрацію ФНП- α в сироватці крові щурів за умов тривалої гіпоацидності та при введенні мультипробіотиків групи "Симбітер".

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проведено на білих нелінійних щурах-самцях віком до двох місяців та масою 170-200 г, які були розділені на чотири групи по 7 тварин в кожній. Маніпуляції з тваринами та їх утримання у віварії здійснювали згідно з міжнародними правилами [6]. Контролем (1-ша група) слугували щури, яким упродовж 28 днів вводили 0,2 мл внутрішньоочеревинно (в/о) та 0,5 мл перорально воду для ін'єкцій. Гіпоацидний стан у тварин (2-га група) моделювали шляхом щоденного введення упродовж 28 днів "Омезу®" (ОМ) (виробництва Dr.Reddy's, Індія), який є блокатором H^+K^+ -АТФази (ключового ферменту синтезу соляної кислоти парієтальними клітинами шлунка). ОМ вводили у вигляді водного розчину в дозі 14 мг/кг в/о. Щурам 3-4 груп одночасно вводили ОМ і мультипробіотики "Симбітер® ацидофільний концентрований" (СИМ) та "Апібакт®" (АПІ) відповідно (виробництва ТОВ "О.Д.Пролісок"). Мультипробіотики вводили у водному розчині перорально в дозі 0,14 мл/кг. Евтаназію тварин здійснювали через добу після останнього введення препаратів. У сироватці крові щурів визначали концентрацію ФНП- α методом імуноферментного аналізу за допомогою комерційних наборів виробництва GE Healthcare (Amersham TNF- α Rat Biotrak ELISA System). Всі зразки були проаналізовані в трьох повторях. В сироватці крові визначали концентрацію гастрину радіоімунним методом із використанням аналітичного набору фірми "MP Biomedicals, LLC" (USA). Статистичну обробку результатів досліджень з використанням критерію Стьюдента для оцінки достовірності в дослідних групах проводили за допомогою

програми Statistica 7.0. Відмінності вважали достовірними при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Експериментальне пригнічення секреції соляної кислоти ОМ в шлунку призводило до зростання концентрації гастрину в плазмі крові з $(59,0 \pm 35,5)$ до $(170,7 \pm 90,7)$ пг/мл, або на 189,3 % ($p < 0,05$) порівняно з контролем. Концентрація ФНП- α в сироватці крові щурів даної групи збільшувалась з $(90 \pm 4,5)$ до $(156 \pm 9,1)$ пг/мл, або на 73 % ($p < 0,05$), порівняно з контролем (рис. 1). Отримані результати досліджень корелюють з даними літератури, згідно з якими при гіпергастринемії посилюється синтез ФНП- α імунними клітинами [14].

В групі щурів, яким упродовж 28 днів одночасно з ОМ вводили СИМ або АПІ, концентрація ФНП- α в сироватці крові знижувалась до $(132 \pm 7,2)$ пг/мл (на 15 %) ($p < 0,05$) і до $(128 \pm 5,9)$ пг/мл (на 18 %) ($p < 0,05$) відповідно порівняно з групою тварин, які отримували лише ОМ. Проте дані показники були достовірно збільшеними, порівняно з контрольною групою, на 47 % ($p < 0,05$) у щурів, яким вводили СИМ, і на 42 % ($p < 0,05$) у тварин, які одержували АПІ (рис. 1). Ефект, встановлений при застосуванні мультипробіотиків за умов тривалої гіпоацидності, може свідчити про їх імуномодулюючий вплив, адже відомо з літератури, що окремі штами пробіотиків зменшують синтез ФНП- α імунними клітинами [4, 11].

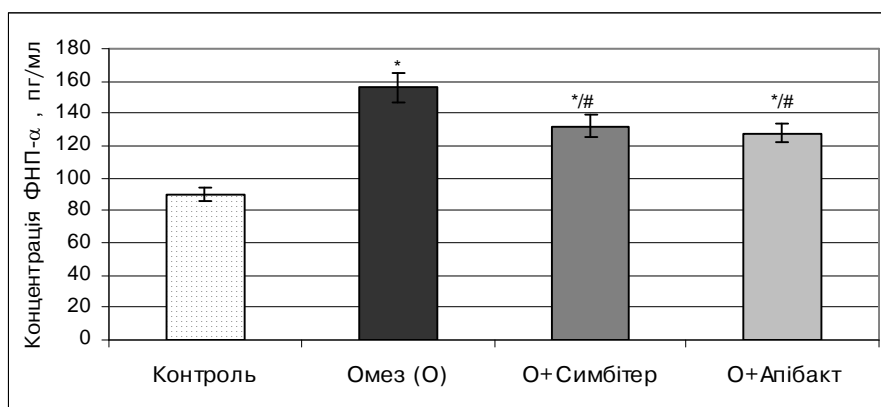


Рис. 1. Концентрація ФНП- α в сироватці крові щурів за умов тривалої гіпоацидності, пг/мл ($n=7$):

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем; # – $p < 0,05$ порівняно з групою тварин, яким вводили “Омес®”.

Отримані результати дають підстави для припущення, що тривале пригнічення секреції соляної кислоти в шлунку “Омесом®” спричиняє не лише гіпергастринемію, а й запальні процеси в організмі через посилення синтезу ФНП- α . Одержані дані також можуть свідчити про залучення цього прозапального цитокіну до механізмів розвитку гіпергастринемії, адже доведено, що він посилює секрецію гастрину G-клітинами [7, 13]. Введення ж мультипробіотиків СИМ і АПІ при тривалій гіпоацидності через нормалізацію мікробіоценозу шлунково-кишкового тракту спричиняє протизапальний ефект, в тому числі завдяки модулюючому впливу на рівень ФНП- α в сироватці крові щурів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Берегова Т.В., Остапченко Л.І., Цирюк О.І. та ін. Профілактична дія мультипробіотиків групи “Симбітер” на структурно-функціональні зміни в травному тракті, викликані тривалим зниженням секреції соляної кислоти // Научно-практическая конференция “Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения”. – Крым, 2009. – С. 225-226.

ВИСНОВКИ. За умов 28-денного пригнічення секреції соляної кислоти в шлунку блокатором H^+K^+ -АТФази “Омесом®” в сироватці крові щурів спостерігається значне зростання концентрації фактора некрозу пухлин альфа та гастрину. Одночасне тривале введення щурам “Омезу®” з мультипробіотиками “Симбітер® ацидофільний концентрований” та “Апібакт®” хоч і не повертає концентрацію сироваткового фактора некрозу пухлин альфа до контрольних значень, але значно зменшує її порівняно з групою тварин, які отримували лише “Омес®”.

2. Телетаева Г.М. Цитокины и противоопухолевый иммунитет // Практическая онкология. – 2007. – 8, № 4. – С. 211-218.

3. Blum S., Schiffrin E.J. Intestinal microflora and homeostasis of the mucosal immune response: implications for probiotic bacteria? // Curr Issues Intest Microbiol. – 2003. – 4 (2). – P. 53-60.

4. Borruel N., Carol M., Casellas F. et al. Increased tumor necrosis factor alpha production in Chron's disease can be downregulated ex vivo by probiotic bacteria // *Gut*. – 2002. – **51**. – P. 659-664.
5. Bradley J.R. TNF-mediated inflammatory disease // *J Pathol*. – 2008. – **214** (2). – P. 149-60.
6. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. National Research Council. – Washington: Nat. Acad. Press, 1996. – 250 p.
7. Hopman W.P., de Jong D.J., Naber A.H., Jansen J.B. Tumour necrosis factor alpha antibody affects gastrin release in Crohn disease // *Scand J Gastroenterol*. – 2003. – **38** (5). – P. 522-525.
8. Jensen R.T. Consequences of long-term proton pump blockade: insights from studies of patients with gastrinomas // *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*. – 2006. – **98**, № 1. – P. 4-19.
9. Kalaitzakis E., Bjornsson E. A review of esomeprazole in the treatment of gastroesophageal reflux disease (GERD) 2007 // *Therapeutics and Clinical Risk Management*. – 2007. – **3**, № 4. – P. 653-663.
10. Lammers K.M., Brigidi P., Vitali B. et al. Immunomodulatory effects of probiotic bacteria DNA: IL-1 and IL-10 response in human peripheral blood mononuclear cells // *FEMS Immunol Med Microbiol*. – 2003. – **38** (2). – P. 165-172.
11. Lee H.S., Han S.Y., Bae E.A. et al. Lactic acid bacteria inhibit proinflammatory cytokine expression and bacterial glycosaminoglycan degradation activity in dextran sulfate sodium-induced colitic mice // *Int Immunopharmacol*. – 2008. – **8** (4). – P. 574-580.
12. Renga M. Rectal cell proliferation and colon cancer risk in patients with hypergastrinaemia // *Gut*. – 1997. – **41**. – P. 330-332.
13. Suzuki T., Grand E., Bowman C. et al. TNF-alpha and interleukin 1 activate gastrin gene expression via MAPK- and PKC-dependent mechanisms // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. – 2001. – **281** (6). – P. G1405-1412.
14. Zavros Y., Kao J.Y., Merchant J.L. Inflammation and Cancer III. Somatostatin and the innate immune system // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. – 2004. – **286**. – P. 698-701.

КОНЦЕНТРАЦІЯ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ АЛЬФА В СЫВОРОТКЕ КРОВІ КРЫС С ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОЙ ГИПОАЦИДНОСТЮ ПРИ ВВЕДЕНИИ МУЛЬТИПРОБИОТИКОВ

А.Г. Короткий, Т.П. Карповец, С.В. Пилипенко, Т.В. Береговая, Л.И. Остапченко
КИЕВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ТАРАСА ШЕВЧЕНКО

Резюме

Установлено значительное повышение концентрации фактора некроза опухолей альфа в сыворотке крови крыс с продолжительным гипоацидным состоянием, которое было вызвано 28-дневным введением "Омеза®". Показано, что одновременное введение "Омеза®" и мультипробиотиков "Симбитер® ацидофильный концентрированный" и "Апибакт®" приводило к значительному уменьшению концентрации исследуемого фактора в сыворотке крови крыс по сравнению с введением одного "Омеза®".

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гипоацидность, мультипробиотик, фактор некроза опухолей альфа.

TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA CONCENTRATION IN BLOOD SERUM IN OF THE RATS WITH LONG-TERM HYPOACIDITY UNDER MULTIPROBIOTIC TREATMENT

O.G. Korotkiy, T.P. Karpovets, S.V. Pylypenko, T.V. Beregova, L.I. Ostapchenko
KYIV NATIONAL UNIVERSITY BY TARAS SHEVCHENKO

Summary

It was showed that 28 days tretment by "Omez®" under long-term hypoacidity iduced significant increase in tumor necrosis facctor alpha. It was established that synchronous administration of "Omez®" and multiprobiotic "Symbiter®acidiphilis concentrated" or "Apybact®" resulted in significant decrease in concentration of the investigated facctor in rat blood serum as compared to administration of "Omez®" alone.

KEY WORDS: hypoacidity, multiprobiotic, tumor necrosis facctor alpha.

Отримано 24.09.2009 р.

Адреса для листування: О.Г. Короткий, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, просп. Глушкова, 12/2, Київ, Україна.

ОБҐРУНТУВАННЯ ВИКОРИСТАННЯ КАЛЬЦИТОНІНУ ДЛЯ КОРЕКЦІЇ СТРУКТУРНИХ ЗМІН В КІСТКОВІЙ ТКАНИНІ НИЖНЬОЇ ЩЕЛЕПИ ЗА УМОВ ЕМОЦІЙНОГО СТРЕСУ ТА ЙОГО ПОЄДНАННЯ З ОВАРІОЕКТОМІЄЮ

М.В. Білець

УКРАЇНСЬКА МЕДИЧНА СТОМАТОЛОГІЧНА АКАДЕМІЯ, ПОЛТАВА

На 62 статевозрілих щурах-самках лінії Вістар досліджено структурні зміни в кістковій тканині нижньої щелепи за умов парціального та поєданого впливу емоційного стресу й оваріоектомії. Встановлено, що найбільш виражені зміни в кістковій тканині мають місце за умов поєднаної дії емоційного стресу та недостатності гонад порівняно з їх парціальним впливом. Корекція структурних змін в кістковій тканині кальцитоніном призвела до пригнічення резорбції тканини.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: кальцитонін, емоційний стрес, оваріоектомія.

ВСТУП. Структурна цілісність скелета підтримується двома різнонаправленими процесами: утворенням нової кісткової тканини (КТ) остеобластами і резорбцією старої кістки остеокластами [5, 6]. Процес перебудови КТ контролюється рядом гормонів: статевими, кальцитропними кортикостероїдами. Для корекції структурних змін в КТ успішно використовують кальцитонін, який є потужним інгібітором активності остеокластів, а відповідно, і кісткової резорбції [6, 8]. Досі існує багато спірних питань відносно впливу гормону на процес остеогенезу, його взаємозв'язку зі статевими гормонами та стресреалізуючими гормонами – катехоламінами, глюкокортикоїдами, а також щодо особливостей дії гормону на окремі ділянки скелета [4, 9, 10].

Метою даної роботи було дослідити доцільність використання кальцитоніну для корекції структурних змін в кістковій тканині нижньої щелепи за умов емоційного стресу та його поєднання з оваріоектомією.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Експерименти виконано на 62 статевозрілих щурах-самках лінії Вістар. При їх проведенні дотримувались рекомендацій щодо медико-біологічних досліджень. Емоційний стрес (ЕС) моделювали за методом Є.А. Юматова та співавт. (1988), оваріоектомію – за методом Я.Д. Кіршенблата

(1969) під ефірним наркозом за 20 днів до початку відтворення ЕС. Евтаназію тварин здійснювали під гексеналовим наркозом (50 мг/кг маси) на четвертий день моделювання ЕС. Корекцію кальцитоніном проводили напередодні та під час моделювання ЕС шляхом підшкірного введення препарату кальцитоніну лосося “Міакальцик” (0,2 мкг/кг) (Novartis, Норвегія). Стан неколагенових білків (протеогліканів та глікопротеїнів) КТ оцінювали шляхом визначення в КТ нижньої щелепи специфічних біополімерів протеогліканів та глікопротеїнів; у мінералізаті КТ визначали вміст кальцію, фосфору (В.К. Леонтьєв, 1975; А.М. Герасімова, 1986; П.Н. Шараєв, 1987; В.С. Камишніков, 2000; J. Dische, 1956; A. Bitter et al., 1968).

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. В ході експериментів встановлено, що за умов ЕС в КТ нижньої щелепи мало місце підвищення вмісту гексуронових кислот (ГК) та N-ацетилнейрамінової кислоти (NANA), що свідчить про посилення розпаду неколагенових білків – глікопротеїнів та протеогліканів (табл. 1). Провідним механізмом цього явища є активація ГГНС [1, 2]. Глюкокортикоїди гальмують синтез кальційзв'язуючих білків, зменшують абсорбцію кальцію в кишечнику та збільшують його екскрецію із сечею, внаслідок чого порушується мінералізація кісткової тканини [4, 6].

Оваріоектомія сприяла достовірному підвищенню рівня тільки гексуронових кислот

© М.В. Білець, 2009.

(табл. 1). Поєднана дія ЕС та оваріоектомії викликала максимальне підвищення рівня ГК, NANA та фукози в КТ нижньої щелепи, що вказує на те, що, ймовірно, дефіцит естрогенів призвів до активації остеокластів [7]. Поєднана дія ЕС та оваріоектомії, на відміну від їх парціального впливу, призвела до зниження рівня кальцію в КТ нижньої щелепи, що є додатковим доказом структурних змін в КТ за умов

вказаних чинників. Введення кальцитоніну сприяло нормалізації показників органічного матриксу та мінеральної фази до рівня контрольних величин (табл. 1). Кальцитонін досить ефективно використовують для профілактики та лікування остеопоротичних змін в кістковій тканині хребців [3, 9, 10]. Результати відносно ефективності дії кальцитоніну на інші ділянки скелета досить суперечливі [6, 9].

Таблиця 1 – Показники органічного та мінерального компонентів кісткової тканини нижньої щелепи за умов емоційного стресу, оваріоектомії та корекції кальцитоніном у щурів-самок (M±m)

Характер досліджень	Гексуронової кислоти, мкмоль/г	NANA, мкмоль/г	Фукоза, мкмоль/г	Кальцій, ммоль/г	Фосфор, ммоль/г
1. Інтактні (n=10)	1,34±0,06	1,62±0,10	1,42±0,06	5,80±0,21	3,16±0,12
2. Емоційний стрес (n=11)	1,73±0,10*	2,01±0,07 [†]	1,48±0,10	5,13±0,35	3,51±0,10
3. Несправжня кастрація (n=8)	1,34±0,17	1,79±0,07	1,44±0,09	4,98±0,20	3,18±0,10
4. Оваріоектомія (n=8)	1,80±0,11 [^]	1,90±0,14	1,45±0,10	5,24±0,14	3,50±0,09
5. Емоційний стрес+оваріоектомія (n=11)	2,00±0,15**	2,74±0,16	1,74±0,06**	4,50±0,12**	3,84±0,10
6. Оваріоектомія+кальцитонін (n=7)	1,48±0,09	1,76±0,14	1,59±0,07	5,25±0,25	3,47±0,18
7. Емоційний стрес+кальцитонін (n=7)	1,53±0,08	2,00±0,17	1,62±0,12	5,98±0,28	3,16±0,16
8. Емоційний стрес+оваріоектомія+кальцитонін (n=8)	1,59±0,14	1,95±0,06	1,68±0,08	5,44±0,31	3,64±0,09

Примітка. * – $p_{1-2}<0,05$; [^] – $p_{1-4}<0,05$; ** – $p_{1-5}<0,05$; – $p_{1-5}<0,01$.

Отже, кальцитонін досить ефективно усуває структурні розлади в КТ нижньої щелепи. Особливо виражений позитивний вплив гормону на КТ нижньої щелепи за умов емоційного стресу та оваріоектомії (табл. 1). Таким чином, кальцитонін можна запропонувати як антитророзорбтивний засіб при остеопорозі різних ділянок скелета, ініційованому емоційним стресом та недостатністю гонад.

ВИСНОВКИ. 1. Найбільш виражені структурні зміни в кістковій тканині нижньої щелепи мають місце за умов поєднаної дії емоційного стресу та недостатності гонад.

2. Кальцитонін ефективно нормалізує структурні зміни в кістковій тканині за умов емоційного стресу та його поєднання з оваріоектомією, що є підставою для подальших досліджень в цьому напрямку.

ЛІТЕРАТУРА

1. Вулдер П.А., Андронов Е.В., Андропова Т.А. Стрессорные реакции и роль пола в их осуществлении // Усп. соврем. биол. – 1999. – № 4. – С. 335-344.
2. Непорада К.С. Взаємозв'язок метаболічних змін у тканинах пародонту при стресі із типологічними особливостями нервової системи та їх корекція: Автореф. дис. ... канд. мед. наук / Харківський державний медичний університет МОЗ України. – Харків, 1995. – 17 с.
3. Поворознюк В.В., Євтушенко О.О. Міакальчик у профілактиці та лікуванні хворих з метаболічними захворюваннями скелета // Укр. мед. часопис. – 1999. – 2, № 10. – С. 49-56.

4. Поворознюк В.В., Мазур И.П. Костная система и заболевания пародонта. – К., 2003. – 446 с.
5. Поворознюк В.В. Остеопороз та біохімічні маркери метаболізму кісткової тканини // Лаб. діагн. – 2002. – № 1. – С. 53-61.
6. Риггз Лоренс Б., Мелтон III Джозеф Л. Остеопороз. Этиология, диагностика, лечение. – СПб.: ЗАО "Изд-во БИНОМ", 2000. – 560 с.
7. Рожинская Л.Я. Остеопороз: Диагностика нарушенный метаболизма костной ткани и кальций-фосфорного обмена // Клини. лаб. диагн. – 1998. – № 5. – С. 11-17.
8. Kraenslin M.E., Seibel M.J., Trechel N. et al. The effect of intranasal salmon calcitonin in a postmenopausal

bone turnover as assessed by biochemical markers // *Calcif. Tissue.* – 1996. – **58**, № 4. – P. 216-220.

9. Overgaard K., Christiansen C. A new biochemical markers of bone resorption markers in monitoring treatment for follow-up on treatment with nasal salmon calcitonin // *Calcif. Tissue.* – 1996. – **59**, № 1. – P. 12-16.

10. Schelemmer D., Raun P., Hassager C., Christiansen C. Morning or evening administration of nasal calcitonin? Effects on biochemical markers of bone turnover // *Bone.* – 1997. – **20**. – P. 63-67.

ОБОСНОВАНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КАЛЬЦИТОНИНА ДЛЯ КОРРЕКЦИИ СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В КОСТНОЙ ТКАНИ НИЖНЕЙ ЧЕЛЮСТИ В УСЛОВИЯХ ЭМОЦИОНАЛЬНОГО СТРЕССА И ЕГО СОЧЕТАНИЯ С ОВАРИОЭКТОМИЕЙ

М.В. Билец

УКРАИНСКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ СТОМАТОЛОГИЧЕСКАЯ АКАДЕМИЯ, ПОЛТАВА

Резюме

На 62 половозрелых крысах-самках линии Вистар исследованы структурные изменения в костной ткани нижней челюсти в условиях парциального и сочетанного влияния эмоционального стресса и овариоэктомии. Установлено, что наиболее выраженные изменения в костной ткани имеют место в условиях сочетанного действия эмоционального стресса и недостаточности гонад по сравнению с их парциальным влиянием. Коррекция структурных изменений в костной ткани кальцитонином привела к угнетению резорбции ткани.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **кальцитонин, эмоциональный стресс, овариоэктомия.**

SUBSTANTIATION OF CALCITONIN USE FOR CORRECTION OF STRUCTURAL CHANGES IN BONE TISSUE OF LOWER JAW UNDER CONDITIONS OF EMOTIONAL STRESS AND ITS COMBINATION WITH OVARIECTOMY

M.V. Bilets

UKRAINIAN MEDICAL STOMATOLOGICAL ACADEMY, POLTAVA

Summary

Structural changes in the bone tissue of the lower jaw were investigated in 62 adult female Wistar rats under conditions of partial and combined influence of emotional stress and ovariectomy. It was found that the most expressive changes in the bone tissue of the lower jaw take place under conditions of emotional stress influence and gonade deficiency in comparing to its partial action. The correction of structural changes in the bone tissue by calcitonin led to decrease of tissues resorption.

KEY WORDS: **calcitonin, emotional stress, ovariectomy.**

Отримано 14.09.2009 р.

Адреса для листування: М.В. Білець, Українська медична стоматологічна академія, вул. Шевченка, 23, Полтава, 36024, Україна.

ВМІСТ НЕЙРОАКТИВНИХ АМІНОКИСЛОТ У ГОЛОВНОМУ МОЗКУ ЩУРІВ ЗА УМОВ ДІЇ ПРОСТИХ ПОЛІЕФІРІВ

В.І. Жуков, О.А. Наконечна, С.О. Стеценко
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Вивчено вміст нейроактивних амінокислот в головному мозку щурів за умов тривалої дії простих поліефірів у дозі 1/100 ЛД₅₀. Встановлено підвищення вмісту збуджувальних (глутамату, аспартату) та зниження рівня гальмівних (ГАМК та гліцину) амінокислот в неокортексі головного мозку тварин.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **прості поліефіри, нейроактивні амінокислоти.**

ВСТУП. Тривалий вплив на організм людини і тварин факторів різної природи (хімічних, фізичних, біологічних) може супроводжуватися змінами гомеостазу, порушенням функціонального стану центральної нервової системи (ЦНС) [1, 3, 5, 6].

В основі функціональної діяльності ЦНС лежить тонка взаємодія між двома процесами нервової діяльності – збудженням та гальмуванням. Ці процеси забезпечуються медіаторами, які здатні взаємодіяти з відповідними рецепторними утворами мембран нейронів. Для нормального функціонування головного мозку має значення стан медіаторних процесів. У забезпеченні гомеостатичної функції організму важлива роль належить нейромедіаторним амінокислотам, одні з яких умовно називають збуджувальними (глутамат, аспартат), інші – гальмівними (гліцин, ГАМК) [4].

Великі обсяги виробництва та широке використання простих поліефірів (ППЕ) як основних компонентів для виготовлення сировини і виробів народного господарства, а також протекторів та пролонгаторів лікарських препаратів [8, 9] зумовлюють актуальність проведення досліджень, спрямованих на поглиблене вивчення механізмів біологічної дії цих сполук.

Метою даної роботи було вивчення вмісту аспартату, глутамату, гліцину та ГАМК в головному мозку щурів за умов тривалої дії простих поліефірів у дозі 1/100 ЛД₅₀.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження виконано на 95 статевозрілих щурах-самцях лінії Вістар масою 200-220 г. Експериментальних

тварин утримували на стандартному раціоні віварію. Щурам дослідних груп перорально за допомогою зонда щодня протягом 30 діб вводили водні розчини: ППЕ на основі пропіленгліколей (ПГ) з молекулярною масою 192, 540, 1120, 2106 (ПГ-192, ПГ-540, ПГ-1120, ПГ-2106); ППЕ на основі гліцеролу (Гл) та ПГ з молекулярною масою 1136 (ГлПГ-1136).

У роботі використано хімічно чисті зразки ППЕ, синтезовані й надані ВНДІ ПАР НВО “Синтез ПАВ” (м. Шебекіно, Росія). Розрахунок необхідної для введення дози речовини проводили з огляду на дані про параметри їх токсичності. В попередніх дослідженнях було встановлено, що для вивчення стану показників біохімічних процесів в організмі щурів найбільш оптимальною дозою є 1/100 ЛД₅₀, яка, відповідно, складала для: ПГ-1120 – 0,048; ПГ-2106 – 0,0145; ПГ-192 – 0,0304; ПГ-540 – 0,018; ГлПГ-1136 – 0,015 г/кг маси тварин. Щурам контрольної групи вводили відповідні об’єми питної води. Дослідження вмісту нейроактивних амінокислот в неокортексі головного мозку здійснювали через 30 діб після початку експерименту. Забій щурів та отримання біологічного матеріалу проводили з дотриманням принципів Гельсінської декларації про гуманне ставлення до тварин. Щурів декапітували гільйотинним ножом, попередньо анестезуючи тіопенталом натрію у дозі 50 мг/кг маси тварин. Після декапітації у них швидко препарували головний мозок. Вміст амінокислот визначали методом рідинної хроматографії на автоматичному аналізаторі амінокислот типу ААА-339 (Чехословаччина). Для проведення калібрувальних тестів, а також для кількісної оцінки хроматограм використовували промис-

лові стандартні розчини амінокислот виробництва фірми "Lachema", що поставляються в наборі реактивів до автоматичного аналізатора амінокислот. Вміст ГАМК визначали після її виділення хроматографічним методом F. Carmona, C. Gomes, G. Frohin [7] на колонках з катіонообмінною смолою Dowex 50w x 4, 200-400 mesh. У дослідних і контрольних групах налічувалось по 10-12 тварин.

Для перевірки гіпотез щодо рівності генеральних середніх двох незалежних, незв'язаних вибірок використовували t-критерій Стью-

дента з попередньою перевіркою нормальності розподілу варіант [2].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Отримані результати свідчать про підвищення вмісту збуджувальних амінокислот та зниження рівня гальмівних амінокислот в неокортексі головного мозку щурів на 30-ту добу спостереження за умов дії ППЕ у дозі 1/100 ДЛ₅₀. Вміст аспартату і глутамату збільшувався в середньому на 13 % порівняно з контролем. Зниження вмісту ГАМК складало 42 %, а гліцину – 26 % (табл. 1).

Таблиця 1 – **Вміст нейроактивних амінокислот у неокортексі головного мозку щурів за дії простих поліефірів (M±m; n=10)**

Речовина	Глутамат	Аспартат	ГАМК	Гліцин
Контроль	7,68±0,32	5,79±0,30	1,97±0,36	1,34±0,08
ПГ-192	8,73±0,14*	6,33±0,13*	1,18±0,21*	0,98±0,03*
ПГ-540	8,62±0,18*	6,45±0,16*	0,95±0,06*	0,87±0,09*
ПГ-1120	9,12±0,14*	6,62±0,14*	1,25±0,14*	1,05±0,07*
ПГ-2106	8,89±0,16*	6,94±0,10*	0,95±0,06*	0,85±0,08*
ГлПГ-498	7,94±0,11	6,11±0,20	1,33±0,07*	1,12±0,07*
ГлПГ-1136	8,60±0,13*	6,97±0,17*	0,98±0,08*	0,82±0,02*
ПнПГ-700	7,65±0,11	6,12±0,21	1,23±0,04*	1,13±0,06*
ПнПГ-790	7,40±0,17	6,16±0,19	1,29±0,06*	1,15±0,05*

Примітка. Вміст виражений в мкмоль/г тканини; * – p<0,05 відносно контролю.

Найбільше зростання вмісту збуджувальних амінокислот спостерігалось за умов впливу ПГ-2106, ПГ-192 та ПГ-1120, а найбільше зниження вмісту гальмівних амінокислот – за дії ПГ-540 та ПГ-2106.

Отримані результати свідчать про те, що тривалий вплив ППЕ у дозі 1/100 ДЛ₅₀ провокує викид медіаторів збудження, перш за все глутамату й аспартату. Глутамат є основним нейропередавачем синаптичного збудження в головному мозку. В останні роки широко використовують термін "глутаматна ексайтотоксичність", що означає гіперстимуляцію медіаторами збудження NMDA-рецепторів, які провокують дилатацію кальцієвих каналів, значне надходження кальцію з подальшою активацією протеаз та фосфоліпаз, синтез оксиду азоту. Гіперферментативна активність призводить до формування порушень цілості як самих клітинних мембран, так і структур органел. Це спричиняє розвиток оксидативного стресу [1], наявність якого спостерігається в організмі щурів за умов тривалої дії ППЕ [3].

Доведено, що за фізіологічних умов існує стабільна рівновага між активностями глутаматергічної та ГАМК-ергічної нейротрансмітер-

них систем. Виявлення різниці в динаміці змін рівня збуджувальних та гальмівних амінокислот свідчить про те, що у розвитку тривалого токсичного впливу ППЕ бере участь не тільки феномен "ексайтотоксичності", а й формування дисбалансу між збуджувальними та гальмівними механізмами з ознаками недостатності захисного гальмування. Доведено, що інгібування у ЦНС, роль якого збільшується за умов підвищеного вивільнення глутамату й аспартату, забезпечують такі нейромедіаторні амінокислоти, як ГАМК та гліцин. Інгібуючі властивості гліцин проявляє в результаті взаємодії не тільки з власними гліциновими рецепторами, але й з рецепторами ГАМК. Гліцин є коагоністом глутаматних NMDA-рецепторів і в субмікромолекулярних концентраціях необхідний для їх нормального функціонування. Гліцин чинить також метаботропну дію, проявляє протисудомну активність, а також має здатність зв'язувати низькомолекулярні токсичні продукти.

ВИСНОВКИ. У механізмі дії простих поліефірів суттєвою ланкою є вплив на ЦНС, який реалізується через розгортання процесів збудження на фоні пригнічення процесів галь-

мування. Це підтверджується підвищенням у неокортексі головного мозку експериментальних тварин вмісту збуджувальних та знижен-

ням рівня гальмівних амінокислот. Найбільш виражений вплив чинила група ППЕ на основі пропіленгліколів (ПГ-2106, ПГ-192 та ПГ-1136).

ЛІТЕРАТУРА

1. Беленічев І.Ф., Левицький Е.Л., Губський Ю.І. Антиоксидантна система захисту організму // Совр. пробл. токсикол. – 2003. – № 2. – С. 32-38.
2. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 154 с.
3. Наконечна О.А. Стан оксидантної системи в організмі щурів за умов дії простих поліефірів // Вісник проблем біології і медицини. – 2008. – № 3. – С. 85-89.
4. Раевский К.С., Георгиев В.П. Медиаторные аминокислоты: нейрофармакологические и нейрохимические аспекты. – М.: Медицина, 1986. – 240 с.
5. Ткачук О.В., Мислицький В.Ф., Сашук М.М. Особливості реагування катехоламінівмісних структур тимуса на різні види стресу // Клінічна та експериментальна патологія. – 2008. – 7, № 3. – С. 1-7.
6. Штабський Б.М., Гжегоцький М.Р. Ксенобіотики, гомеостаз і хімічна безпека людини. – Львів: Наутилус, 1999. – 308 с.
7. Carmona F., Gomes C., Frolin G. Purification of GABA on small columns of Dowex 50w, combination with a method for separation of biogenic amines // Acta Pharmacol. Toxicol. – 1980. – 46. – P. 235-240.
8. Torchilin V.P. Immunoliposomes and PEGylated immunoliposomes: possible use for targeted delivery of imaging agents // Immunomethods. – 1994. – 4, № 3. – P. 244-258.
9. Torchilin V.P., Omelyanenko V.G., Papisov M.I. Poly(ethyleneglycol) on the liposome surface: on the mechanism of polymer-coated liposome longevity // Biochem. Biophys. Acta. – 1994. – 1195, №1. – P. 11-20.

СОДЕРЖАНИЕ НЕЙРОАКТИВНЫХ АМИНОКИСЛОТ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ КРЫС В УСЛОВИЯХ ДЕЙСТВИЯ ПРОСТЫХ ПОЛИЭФИРОВ

В.И. Жуков, О.А. Наконечная, С.А. Стеценко
ХАРЬКОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

Резюме

Изучено содержание нейроактивных аминокислот в головном мозге крыс в условиях длительного действия простых полиэфиров в дозе 1/100 ЛД₅₀. Установлено повышение содержания возбуждающих (глутамата и аспартата) и снижение уровня тормозных (ГАМК и глицина) аминокислот у неокортексе головного мозга животных.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **простые полиэфиры, нейроактивные аминокислоты.**

INFLUENCE OF SIMPLE POLYETHERS ON NEUROACTIVE AMINOACIDS CONTENT IN BRAIN OF RATS

V.I. Zhukov, O.A. Nakonechna, S.A. Stetsenko
KHARKIV NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY

Summary

The levels of neuroactive aminoacids in brain of rats after exposure to simple polyethers in 1/100 LD₅₀ action have been studied. The increase of excitatory aminoacids (glutamate, aspartate) content and decrease of inhibitory mediators (GABA, glycine) level were found.

KEY WORDS: **polyethers, neuroactive aminoacids.**

Отримано 14.09.2009 р.

Адреса для листування: В.І. Жуков, Харківський національний медичний університет, просп. Леніна, 4, Харків, 61022, Україна.

ВПЛИВ ХЛОРИДУ КОБАЛЬТУ ТА ЕКСТРАКТУ ВИНОГРАДНИХ КІСТОЧОК НА ПОКАЗНИКИ СТРЕС-РЕАКЦІЇ ТА АЗОТНОГО ОБМІНУ В ЩУРІВ

С.М. Охріменко, Н.Є. Панова, М.А. Журова, А.Л. Загайко
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ В.Н. КАРАЗІНА
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ХАРКІВ

Досліджено вплив хлориду кобальту та екстракту виноградних кісточок на вміст глікогену, активність тирозинамінотрансферази (ТАТ) та вміст SH-груп в печінці, а також вміст сечовини та креатиніну в сироватці крові щурів. Введення хлориду кобальту спричинило зниження вмісту глікогену та вільних SH-груп в печінці й підвищувало активність ТАТ в печінці та вміст сечовини і креатиніну в сироватці. Застосування екстракту виноградних кісточок в ряді випадків запобігало змінам досліджуваних показників, спричиненим введенням хлориду кобальту.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **хлорид кобальту, екстракт виноградних кісточок, оксидативний стрес, щури.**

ВСТУП. Надходження в організм сполук важких металів та металів зі змінною валентністю спричиняє пошкодження всіх типів біомолекул, посилення процесів перекисного окиснення ліпідів та розвиток оксидативного стресу. При цьому в організмі формуються захисні реакції, спрямовані на збереження гомеостазу, – активується система антиоксидантного захисту, посилюються процеси енергозабезпечення тощо [4, 7, 11]. З метою зменшення наслідків впливу оксидативного стресу на організм широко застосовують різні антиоксиданти. Їх джерелом, зокрема, може бути екстракт виноградних кісточок, що містить поліфеноли, для яких характерні значні антиоксидантні властивості [2, 3, 12]. У зв'язку з цим, метою даного дослідження було вивчення впливу екстракту виноградних кісточок на показники стрес-реакції та азотного обміну при дії хлориду кобальту.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Об'єкт дослідження – 24 щури-самці лінії Вістар масою 160-200 г. Екстракт кісточок винограду сорту Мерло, отриманого в Національному інституті винограду та вина “Магарач” (м. Ялта), вводили в шлунок тварин в дозі 0,25 мл на 100 г маси щоденно протягом двох тижнів. Хлорид кобальту вводили внутрішньочеревно в дозі 3 мг на 100 г маси, через 4 год щурів декапітували під легким ефірним наркозом. В печінці визнача-

ли вміст глікогену за методом Камп [1], активність ТАТ за методом [10], вміст SH-груп за методом [9]; в сироватці визначали вміст сечовини та креатиніну за допомогою промислових наборів.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Дані таблиці 1 свідчать про те, що введення хлориду кобальту спричинило активацію симпатико-адреналової та гіпофізарно-надниркової систем регуляції метаболізму і розвиток стрес-реакції, що проявлялось зниженням вмісту глікогену та зростанням активності ТАТ в печінці щурів [5, 6]. У тварин, що попередньо отримували екстракт виноградних кісточок, при введенні хлориду кобальту вміст глікогену не відрізнявся від контролю, проте активність ТАТ була підвищеною.

При оксидативному стресі відбувається окиснення вільних SH-груп в тиолових сполуках [8], серед яких розрізняють білки та небілкові речовини, зокрема глутатіон. Отримані нами результати (табл. 2) свідчать про зниження вмісту як білкових, так і небілкових SH-груп при введенні хлориду кобальту. Застосування екстракту виноградних кісточок перед введенням розчину солі не відновлювало вміст білкових та небілкових SH-груп, проте їх вміст був вірогідно вищим, ніж у тварин, яким вводили лише хлорид кобальту.

Розвиток стрес-реакції при дії різних чинників супроводжується активацією глюконеогенезу з амінокислот та посиленням азотного метаболізму [5]. Дані таблиці 3 свідчать про

Таблиця 1 – Вміст глікогену та активність ТАТ в печінці щурів при введенні хлориду кобальту й екстракту виноградних кісточок

	контроль	CoCl ₂	CoCl ₂ +екстракт
глікоген, г/100 г тканини	3,78±0,18	1,95±0,15*	3,17±0,13
ТАТ, нмоль р-ОФП/хв/мг білка	1,45±0,21	2,65±0,23*	2,52±0,18*

Примітка. * – тут і далі $p \leq 0,05$ порівняно з контролем.

Таблиця 2 – Вміст загальних, білкових та небілкових SH-груп в печінці щурів при введенні хлориду кобальту й екстракту виноградних кісточок (мкмоль/кг)

	контроль	CoCl ₂	CoCl ₂ +екстракт
загальні	53,6±1,8	20,6±0,5*	32±0,7*#
білкові	30,1±2,2	18,7±0,7*	22,2±0,5*#
небілкові	27,9±2,1	6,4±0,8*	10,7±0,5*#

Примітка. # – $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, що отримували лише хлорид кобальту.

Таблиця 3 – Вміст сечовини та креатиніну в сироватці крові щурів при введенні хлориду кобальту й екстракту виноградних кісточок

	контроль	CoCl ₂	CoCl ₂ +екстракт
сечовина, ммоль/л	1,5±0,3	3,7±0,4*	3,1±0,2*
креатинін, мкмоль/л	15,7±1,1	23,2±2,2*	23,7±2,7*

підвищення вмісту сечовини та креатиніну в сироватці крові при введенні хлориду кобальту. При застосуванні екстракту виноградних кісточок перед введенням розчину солі вміст сечовини та креатиніну в сироватці був підвищеним, як і при введенні одного хлориду кобальту.

Як свідчать отримані нами дані, введення екстракту виноградних кісточок нормалізує ряд показників, змінених при введенні хлориду кобальту, і, таким чином, сприяє адаптації організму до дії пошкоджуючих чинників довкілля. Загальновідомими є антиоксидантні властивості винограду та його продуктів, що

зумовлено високим вмістом в них поліфенольних сполук [2, 3, 12]. Застосований нами екстракт є продуктом нової технології, що дозволяє найбільшою мірою використовувати дешеву сировину як матеріал для вироблення біологічно активних добавок з метою підвищення адаптаційних можливостей організму.

ВИСНОВОК. Отримані дані можуть свідчити про участь хімічних складових екстракту виноградних кісточок, зокрема поліфенолів, у формуванні захисних реакцій при оксидативному стресі.

ЛІТЕРАТУРА

1. Буланкіна Н.І., Охріменко С.М., Ганусова Г.В. Методи дослідження ліпідів та вуглеводів: Методичні вказівки до спецпрактикуму. – Х.: ХНУ ім. В.Н. Каразіна, 2006. – 52 с.
2. Загайко А.Л. Порівняльний аналіз антиоксидантної активності α -токоферолу та поліфенольного екстракту з листя винограду культурного при оксидативному стресі, викликаному введенням хлориду кобальту // Наук. зап. Терноп. держ. пед. ун-ту. Серія: Біологія. – 2004. – №1,2. – С. 86-91.
3. Загайко А.Л., Вороніна Л.М., Стрельченко К.В. Метаболічний синдром: механізми розвитку та перспективи антиоксидантної терапії. – Вид-во НФаУ: Золоті сторінки, 2007. – 216 с.
4. Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З. и др. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. – М.: Слово, 2006. – 556 с.
5. Калиман П.А., Охрименко С.М. Цикл глюкоза-жирные кислоты при оксидативном стрессе у крыс, вызванном хлоридом кобальта // Укр. біохім. журн. – 2005. – **77**, № 2. – С. 154-158.
6. Мертвцов Н.П. Регуляция экспрессии генов стероидными гормонами. – Новосибирск: Наука, 1990. – 262 с.
7. Саприн А.Н., Калинина Е.В. Окислительный стресс и его роль в механизмах апоптоза и развитии патологических процессов // Усп. биол. химии. – 1999. – **39**. – С. 289-326.

8. Соколік В.В. Вплив хлоридів кобальту і меркурію на пероксидне окислення ліпідів, систему тіолів та активність глутатіонзалежних антиоксидантних ферментів: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Харків, 2004. – 19 с.

9. Фоломеев В.Ф. Фотоколориметрический ультрамикрометод количественного определения сульфгидрильных групп белков и небелковых соединений крови // Лаб. дело. – 1981. – № 1. – С. 33-35.

10. Schepard B. New Method for Assay of Tyrosine Transaminase // Anal. Biochem. – 1969. – 30. – P. 443-448.

11. Valko M., Morris H., Cronin M.I. Metals, toxicity and oxidative stress // Curr. Med. Chem. – 2005. – 12, № 10. – P. 1161-1208.

12. Yilmaz Y., Toledo R.T. Major flavonoids in grape seeds and skins. Antioxidant capacity of catechin, epicatechin and gallic acid // J. Agric. Food Chem. – 2004. – 52. – P. 255-260.

ВЛИЯНИЕ ХЛОРИДА КОБАЛЬТА И ЭКСТРАКТА ВИНОГРАДНЫХ КОСТОЧЕК НА ПОКАЗАТЕЛИ СТРЕСС-РЕАКЦИИ И АЗОТНОГО ОБМЕНА У КРЫС

С.М. Охрименко, Н.Е. Панова, М.А. Журова, А.Л. Загайко
ХАРЬКОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ В.Н. КАРАЗИНА
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

Резюме

Исследовано влияние хлорида кобальта и экстракта виноградных косточек на содержание гликогена, активность тирозинаминотрансферазы (TAT) и содержание SH-групп в печени, а также содержание мочевины и креатинина в сыворотке крови крыс. Введение хлорида кобальта вызывало снижение содержания гликогена и свободных SH-групп в печени и повышало активность TAT в печени и содержание мочевины и креатинина в сыворотке. Применение экстракта виноградных косточек в ряде случаев предотвращало изменения исследуемых показателей, вызванные введением хлорида кобальта.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: хлорид кобальта, экстракт виноградных косточек, оксидативный стресс, крысы.

INFLUENCE OF COBALT CHLORIDE AND GRAPE SEED EXTRACT ON INDICES OF STRESS-REACTION AND NITRIC METABOLISM AT RATS

S.M. Okhrimenko, N.Ye. Panova, M.A. Zhurova, A.L. Zahayko
KHARKIV NATIONAL UNIVERSITY BY V.N. KARAZIN
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

Summary

Cobalt chloride and grape seed extract influence on the glycogen content, tyrosine aminotransferase activity (TAT) and SH-groups content in liver, as well as carbamide and creatinine content in blood serum of rats has been investigated. The injection of cobalt chloride leads to decreasing glycogen free SH-groups content in liver and increasing TAT activity, urea and creatinine content in blood serum raising. Grape seed extract using prevented changes of researched parameters caused by cobalt chloride injection in a number of cases.

KEY WORDS: cobalt chloride, grape seed extract, oxidative stress, rats.

Отримано 15.09.2009 р.

Адреса для листування: С.М. Охрименко, Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, 61077, Україна.

ВПЛИВ ЙОДНОЇ ЗАБЕЗПЕЧЕНОСТІ ОРГАНІЗМУ НА ФОРМУВАННЯ АМІНОКИСЛОТНИХ РЕЗЕРВІВ СИРОВАТКИ КРОВІ У БІЛИХ ЩУРІВ ПРИ ГІПЕРТЕРМІЇ

Л.М. Ростока¹, І.М. Туряниця²УЖГОРОДСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ¹
СЛОВАЦЬКИЙ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИЙ УНІВЕРСИТЕТ²

Вивчено вплив гіпертермії (7, 20, 50 хв) на амінокислотні резерви сироватки крові у білих щурів в умовах повноцінного раціону та при експериментальному йодному дефіциті. Гіпертермія викликає дисбаланс вільних АК в крові щурів, який в умовах повноцінного раціону розвивається лише через 50 хв перегріву, а при йодному дефіциті – вже починаючи з 7 хв, що вказує на знижені адаптаційні можливості організму при йодній недостатності, неспроможність йодно-тиреоїдної регуляції метаболізму амінокислот і нездатність тканин при цьому вже через 7 хв перегріву мобілізувати АК на потреби організму при тепловому стресі.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: гіпертермія, йодний дефіцит, амінокислоти.

ВСТУП. Згідно з сучасними уявленнями, стрес-синдром має системний характер і реалізується з участю нейрогенних та гуморальних факторів. Стрес значно впливає на функцію щитоподібної залози, гормонам якої належить провідна роль в регуляції метаболізму, зокрема інтенсивності біоенергетичних реакцій клітини, адаптаційно-трофічних реакцій організму, регуляції імунітету [2, 4]. Дефіцит йоду у навколишньому середовищі призводить до розвитку йодної недостатності і порушення функції щитоподібної залози. Розлади тиреоїдної регуляції можуть відбиватись на функціях ЦНС, що в комплексі здійснюють нейроендокринний контроль метаболізму амінокислот [6].

Нами досліджено формування резервів вільних амінокислот (АК) в сироватці крові щурів в умовах термічного стресу (перегрів) на фоні повноцінного раціону та після тримісячного утримання тварин на малоїодному раціоні, що складався з продуктів, вироблених чи вирощених в гірській зоні Карпат з екологічно вираженим йодним дефіцитом.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. У дослід ввійшли 54 однорічні білі щури. Перша група тварин (24) утримувалась на стандартному раціоні віварію. Друга група білих щурів утримувалась на малоїодному раціоні [6].

Експериментальний перегрів у тварин був викликаний підвищенням температури доквілля. Цей спосіб розцінюється як єдиний метод одержання "моделі", що адекватна гіпертермії у тварин (людини), яка настає в результаті обмеження тепловтрат [1]. Тварин поміщали в повітряний термостат, де на них діяли високою температурою ((45±1) °С) про-

тягом 7, 20 та 50 хв. Максимальний строк перегріву щури витримували важко. При цьому 7 хв перегрів не супроводжувався підвищенням температури тіла, при 20 хв дії ректальна температура підвищувалась до 39,6 °С, а при 50 хв. – до 43 °С при нормі 37,4 °С.

АК сироватки крові визначали методом нисхідної хроматографії на папері [3].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Підвищена температура зовнішнього середовища виражено впливає на організм, в тому числі і резерви вільних амінокислот сироватки крові, що залежить від часу теплової дії.

Так, в сироватці крові білих щурів в умовах повноцінного раціону, на яких короткочасно діяв тепловий удар (7 хв), визначалось зниження вмісту більшості вільних амінокислот відносно показників у нормотермних тварин, що продовжувалось і до 20 хв перегріву (табл. 1). Збільшення часу знаходження тварин в екстремальних умовах перегріву (50 хв) супроводжувалось різко вираженим в сироватці крові зростанням рівнів Цист з Цист та Гіс, але зниженням фондів Орн, Ліз, Арг, Асп, Сер, Глі, Глу, Про, Тир, Три, Мет, Вал, Лей з Лей відносно контролю. В динаміці ж перегріву до цього часу спостерігається накопичення резервів Цист з Цист, Гіс, Сер, Глу, Тре, Ала, але зниження рівнів Ліз, Мет і Вал.

Зменшення тканинних резервів вільних амінокислот при короткочасній тепловій дії, що збігається зі збереженням в цей термін відповідної до йодної забезпеченості гормональної функції щитоподібної залози [5], ймовірно, пов'язане з відтоком їх з крові і більш інтенсивним використанням на потреби тканин, включаючи різні метаболічні ланки, в т.ч. енергетичний обмін та терморегуляцію, а дисбаланс

фондів амінокислот до 50 хв перегріву ми відносимо на рахунок порушення їх обміну і зниження швидкості їх використання в процесі біосинтезу білка та інших метаболічних шляхах в умовах суттєвого зменшення йодно-тиреїдної забезпеченості, а тим самим і регуляції.

Таблиця 1 – Резерви вільних амінокислот в сироватці крові білих щурів, що утримувались на повноцінному раціоні при гіпертермії (ммоль/л)

АК	Контроль n = 12	7 хв n = 5	20 хв n = 6	50 хв n = 6
Цис+цист	0,121±0,0108	0,065±0,0091*	0,045±0,0042*	0,065±0,0058* **
Орн	0,042±0,0030	0,032±0,0030*	0,019±0,0023* **	0,022±0,0008*
Ліз	0,049±0,0034	0,042±0,0068*	0,044±0,0041	0,018±0,0014* **
Гис	0,047±0,0032	0,021±0,0045*	0,024±0,0045*	0,063±0,0026* **
Арг	0,055±0,0040	0,030±0,0034*	0,035±0,0034*	0,041±0,0023*
Асп	0,306±0,0097	0,114±0,0060*	0,070±0,0090* **	0,085±0,0045*
Сер	0,133±0,0133	0,040±0,0057*	0,034±0,0019*	0,103±0,0029* **
Гли	0,115±0,0053	0,044±0,0053*	0,032±0,0040*	0,037±0,0027*
Глу	0,101±0,0034	0,050±0,0041*	0,022±0,0020* **	0,082±0,0020* **
Тре	0,109±0,0101	0,055±0,0059*	0,033±0,0017* **	0,121±0,0059 **
Ала	0,234±0,0292	0,095±0,0067*	0,033±0,0045* **	0,238±0,0090 **
Про	0,153±0,0087	0,051±0,0078*	0,076±0,0096*	0,070±0,0061*
Тир	0,044±0,0017	0,025±0,0039*	0,019±0,0028*	0,025±0,0017*
Три	0,118±0,0059	0,045±0,0078*	0,040±0,0054*	0,033±0,0039*
Мет	0,029±0,0020	0,034±0,0060	0,032±0,0047	0,015±0,0007* **
Вал	0,031±0,0017	0,044±0,0068	0,034±0,0051	0,015±0,0009* **
Фен	0,038±0,0042	0,036±0,0030	0,046±0,0067	0,039±0,0036
Лей +іле	0,137±0,0076	0,018±0,0030*	0,060±0,0076* **	0,051±0,0023*

Примітка. * та ** – показники достовірні відносно контролю та попередньої групи відповідно.

Встановлено, що в умовах йодної нестачі вже короткочасна (7 хв) дія підвищеної температури у білих щурів викликає розбалансування рівнів АК в сироватці крові, що продовжується до 50 хв досліду (табл. 2). Це свідчить про зниження адаптаційних можливостей організму та здатності тканин до широкомас-

штабного залучення вільних амінокислот в процеси метаболізму, зокрема ті, які проходять з поглинанням енергії. Причому при гіпертермії в умовах йодного дефіциту в порівнянні з показниками на повноцінному раціоні у білих щурів в сироватці крові відмічено вищу кількість вільних АК. Це, ймовірно, результат

Таблиця 2 – Резерви вільних амінокислот в сироватці крові білих щурів, що утримувалися в умовах йодної недостатності при гіпертермії (ммоль/л)

АК	Інтактні n = 7	7 хв n = 6	20 хв n = 6	50 хв n = 6
Цист+цист	0,139±0,0078	0,092±0,0051*	0,130±0,0079**	0,132±0,0087
Орн	0,064±0,0030	0,065±0,0043	0,030±0,0036* **	0,050±0,0027* **
Ліз	0,045±0,0029	0,032±0,0029*	0,064±0,0034* **	0,039±0,0041**
Гис	0,041±0,0032	0,067±0,0050*	0,030±0,0032* **	0,025±0,0035*
Арг	0,065±0,0028	0,086±0,0038*	0,104±0,0098*	0,069±0,0046**
Асп	0,864±0,0849	0,510±0,1180*	0,590±0,0481*	1,052±0,0443**
Сер	0,410±0,149	0,729±0,0276*	0,458±0,0228**	0,504±0,0235*
Гли	0,151±0,0105	0,151±0,0097	0,176±0,0186	0,113±0,0075* **
Глу	0,098±0,0300	0,120±0,0079	0,137±0,0087	0,215±0,0097* **
Тре	0,207±0,0117	0,218±0,0131	0,179±0,0104**	0,158±0,0073
Ала	0,145±0,0113	0,293±0,0178*	0,219±0,0108* **	0,295±0,0128* **
Про	0,076±0,0069	0,091±0,0132	0,115±0,0109**	0,051±0,0074* **
Тир	0,055±0,0031	0,042±0,0031*	0,040±0,0036*	0,066±0,0042**
Три	0,125±0,0101	0,109±0,0086	0,098±0,0119	0,256±0,0295* **
Мет	0,094±0,0087	0,090±0,0080	0,186±0,0123* **	0,119±0,0137**
Вал	0,109±0,0088	0,093±0,0089	0,103±0,0142	0,096±0,0102
Фен	0,074±0,0067	0,089±0,0114	0,096±0,0122	0,072±0,0065
Лей +іле	0,188±0,0175	0,188±0,0132	0,160±0,0199	0,188±0,0178

зниженої йодно-тиреоїдної регуляції метаболізму, зокрема амінокислотного, при дії підвищеної температури в умовах йодної недостатності і, як наслідок, нездатності тканин адекватно засвоювати та включати амінокислоти в різні метаболічні шляхи, оскільки супроводжується зниженням рівня висококалоригенного T_3 зі збідненням йодної забезпеченості більшості тканин за рахунок зростання екскреції з сечею та, ймовірно, виділення з потом, що особливо загрозово знейодненням для тварин в умовах малоїодного раціону [5].

ВИСНОВКИ. Гіпертермія викликає дисбаланс вільних АК в сироватці крові шурів, який в умовах повноцінного раціону розвивається лише через 50 хв перегріву, а при йодному дефіциті – вже починаючи з 7 хв, що вказує на знижені адаптаційні можливості організму при йодній недостатності, неспроможність йодно-тиреоїдної регуляції метаболізму амінокислот і нездатність тканин при цьому вже через 7 хв перегріву мобілізувати АК на потреби організму при стресі.

ЛІТЕРАТУРА

1. Воспроизведение заболеваний у животных для экспериментально-терапевтических исследований / Под ред. Н.В. Лазарева. – Л.: Медгиз, 1954. – 392 с.
2. Кандрор В.И. Молекулярно-генетические аспекты тиреоидной патологии // Проблемы эндокринологии. – 2002. – 47, № 7. – С. 3-10.
3. Пасхина Т.С. Количественное определение аминокислот при помощи хроматографии на бумаге // Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1964. – 1. – С. 162-180.

4. Kopp P., Jamerson J.L. Principles of Molecular Medicine / Ed. J.L. Jamerson. – Totowa, 1998. – P. 459-473.
5. Rostoka L.M., Turianitsa I. The influence of hyperthermia on iodine-thyroid supply of white rat's organism depending on iodine-fluorine supply// Lucrari Stiintifice Zootehnie si Biotehnologii. – 2007. – 40, № 1. – P. 378-383.
6. Turianica I., Angelovicova M., Rostoka L.et al. Enviromental iodine deficit and problems connected with it // Nitra. – 2007. – 211 p.

ВЛИЯНИЕ ЙОДНОЙ ОБЕСПЕЧЕННОСТИ ОРГАНИЗМА НА ФОРМИРОВАНИЕ АМИНОКИСЛОТНЫХ РЕЗЕРВОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ У БЕЛЫХ КРЫС ПРИ ГИПЕРТЕРМИИ

Л.М. Ростока¹, И.М. Турияница²
УЖГОРОДСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ¹
СЛОВАЦКИЙ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ²

Резюме

Изучено влияние гипертермии (7, 20, 50 мин) на аминокислотные резервы сыворотки крови у белых крыс в условиях полноценного рациона и при экспериментальной йодной недостаточности. Показано, что гипертермия вызывает дисбаланс свободных АК в сыворотке крови белых крыс, который в условиях полноценного рациона развивается только через 50 мин перегрева, а при йодном дефиците – уже начиная с 7 мин, что указывает на сниженные адаптационные возможности организма при йодной недостаточности, несостоятельность йодно-тиреоидной регуляции метаболизма аминокислот и неспособность тканей уже через 7 мин перегрева мобилизовать АК на нужды организма при тепловом стрессе.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гипертермия, йодный дефицит, аминокислоты.

INFLUENCE OF IODINE SUPPLY OF THE ORGANISM ON AMINO ACID RESERVE FORMATION IN BLOOD SERUM OF WHITE RATS UNDER HYPERTHERMIA

L.M. Rostoka¹, I.M. Turianytsia²
UZHGOROD NATIONAL UNIVERSITY¹
SLOVAKIAN AGRICULTURAL UNIVERSITY²

Summary

The influence of hyperthermia (7, 20, 50 min.) upon amino acid reserves of blood serum in white rats under full-fledged ration and experimental iodine deficiency has been investigated. Hyperthermia results in free amino acid disbalance in the blood of white rats' which develops only in 50 minutes of overheating under full-fledged ration, while under iodine insufficiency it starts from the 7th minute. It points on to the lowering of adaptative ability of the organism under iodine insufficiency, to the failure in iodine-thyroid regulation of amino acid metabolism and the tissues disability to mobilize amino acids in 7 minutes' period of overheating.

KEY WORDS: hyperthermia, iodine deficiency, amino acids.

Отримано 15.09.2009 р.

Адреса для листування: Л.М. Ростока, Ужгородський національний університет, пл. Народна, 1, Ужгород, 88000, Україна.

ЙМОВІРНА УЧАСТЬ МЕТАЛОТІОНЕЇНІВ ЖАБИ *RANA RIDIBUNDA* В АНТИОКСИДАНТНОМУ ЗАХИСТІ ЗА ВПЛИВУ ІОНІВ МІДІ ТА ЦИНКУ

Л.Д. Романчук, Г.І. Фальфушинська, О.Б. Столяр
 ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ ПЕДАГОГІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ВОЛОДИМИРА ГНАТЮКА

Іони міді й цинку в екологічно реальних концентраціях пригнічували Mn- та Cu,Zn-супероксиддисмутазну і каталазну активності в печінці жаби *Rana ridibunda*, однак тільки іони цинку викликали посилення утворення супероксиданіона та перекисного окиснення ліпідів, а також пригнічення ацетилхолінестеразної активності. Обговорюється роль Cu-металотіонеїнів, вміст яких значно зростає за дії міді, але не цинку, в антиоксидантному захисті.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: жаба *Rana ridibunda*, оксидативний стрес, металотіонеїни, мідь, цинк.

ВСТУП. Іони d-металів є одними з найбільш відомих прооксидантів, що для металів змінної валентності пояснюється безпосередньою участю в редоксзалежних процесах, а для металів зі стабільною валентністю асоціюється із здатністю координувати тіолові групи [6]. Проте філогенетичні аспекти цієї дії практично не досліджені [5, 6]. Вивчення системи антиоксидантного захисту амфібій викликає особливий інтерес у зв'язку з частою зміною кисневих режимів протягом їх життя [3]. Нами показано, що в печінці жаби акумулюється надзвичайно велика кількість міді [2]. Тому цікаво було порівняти відповідь системи антиоксидантного захисту печінки жаби на вплив іонів міді та цинку в екологічно реальних концентраціях.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проводили у липні на дорослих особинах (самцях) жаби (*Rana ridibunda* L.) масою 8-10 г. Жаб для дослідження відбирали у лісовій місцевості, акліматизували протягом 7 днів в акваріумах місткістю 40 л у відстояній водопровідній воді, яку піддавали аерації. Після цього їх витримували впродовж 14 днів у дослідних умовах. Одна група була контрольною, іншим у воду додавали іони міді або цинку. Вміст у воді Cu^{2+} (CuSO_4) складав за катіоном 0,01 мг/л, Zn^{2+} (ZnSO_4) – 0,1 мг/л. Воду відстоявали і змінювали кожних дві доби, поновлюючи вміст металів. Тварин годували комерційним кормом для черепах (Turtle menu, "Aqaurius", Харків).

Експеримент на жабах проводили з дозволу Міністерства охорони навколишнього природного середовища України (№ 292) та

відповідно до Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та наукових цілей (Страсбург, 1986), ухвали Першого національного конгресу з біоетики (Київ, 2000). Тварин умертвляли під етерним наркозом. Для дослідження використовували печінку. Відбір тканини проводили на холоді за температури близько 4 °С.

Стан антиоксидантної системи печінки оцінювали за активністю супероксиддисмутаз (СОД) [КФ 1.15.1.1], каталази (КАТ) [КФ 1.11.1.6], утворенням супероксиданіона та продуктів пероксидації ліпідів (ТБК-АП). Вміст металотіонеїнів (МТ) визначали за кількістю тіолів, а активність ацетилхолінестерази (АХЕ) [КФ 3.1.1.7] – за швидкістю гідролізу ацетилтіохолілйодиду. Використані методи дослідження детально описано в нашій роботі [1]. Результати вимірів подано у вигляді $M \pm m$ для 6 тварин. Вірогідність відмінності двох рядів значень обчислювали з використанням t-тесту Стьюдента. Достовірною вважали відмінність між рядами за $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Як свідчать одержані результати (табл. 1), дія обох чинників викликала зменшення активності СОД, особливо мітохондріальної Mn-СОД, за дії цинку, а також КАТ. Разом із тим, лише дія цинку спричиняла зростання продукції ТБК-АП та супероксиданіона. Вміст МТ у тканині збільшувався за дії обох типів іонів, але особливо істотно (у 4 рази) – за дії міді. Для інтегральної оцінки ураження організму ми визначали також активність АХЕ і виявили істотне її зменшення, особливо за дії цинку.

© Л.Д. Романчук, Г.І. Фальфушинська, О.Б. Столяр, 2009.

Таблиця 1 – Біохімічні показники стану печінки жаби за дії на організм іонів міді та цинку (M±δ, n=6)

Показник	Контроль	Мідь	Цинк
Активність Cu,Zn-СОД, ум.од./мг білків	0,57±0,22	0,37±0,04 ^a	0,26±0,03 ^{a,b}
Активність Mn-СОД, ум.од./мг білків	1,61±0,78	0,19±0,02 ^a	0,11±0,01 ^{a,b}
Активність каталази, ммоль/хв·мг білків	2,0±0,5	1,5±0,3 ^a	0,7±0,1 ^{a,b}
Утворення ТБК-активних продуктів, нмоль/г тканини	35,2±4,3	32,8±0,6	48,6±1,7 ^{a,b}
Утворення супероксиданіона, мкмоль/ хв·г тканини	0,78±0,13	0,67±0,06	0,93±0,09 ^{a,b}
Вміст металотіонеїнів, мкг/г тканини	12,2±3,4	48,1±5,5 ^a	28,3±2,4 ^{a,b}
Активність ацетилхолінестерази, нмоль/хв·мг білків	129,7±50,2	29,2±2,2 ^a	15,9±1,3 ^{a,b}

Примітка. ^a – відмінність, порівняно з контролем, вірогідна, ^b – відмінність між впливом міді й цинку вірогідна, p<0,05.

Отже, за дії міді чинники антиоксидантного захисту печінки жаби ефективно утилізували супероксиданіон та захищали ліпіди від оксидативного ураження на відміну від дії цинку. Відмінність у ступені ураження підтверджують і результати визначення АХЕ. Унікальна здатність жаб адаптуватись до високих концентрацій міді, як видно з отриманих результатів, може бути пов'язана з функцією МТ. Здатність іонів міді індукувати синтез МТ продемонстрована [4] після 15 діб інкубації тварин за присутності 50 та 100 мг/л міді, й лише після 30 діб інкубації підвищення вмісту міді в тканині не супроводжувалось посиленням експресії МТ. Разом з тим, низка робіт показує токсичність цинку для жаб уже за дії 4 мг/л [3]. МТ жаби, за нашими даними [2], зв'язують

лише 1-3 % міді у тканині печінки, проте в складі МТ її частка суттєва – близько 30 % атомів металів, тоді як в інших хребетних – не більше 10 % атомів [5]. На нашу думку, саме ця філогенетична особливість гомеостазу металів у жаб пояснює високу ефективність антиоксидантного захисту за дії міді та її відсутність за дії цинку.

ВИСНОВОК. Підвищення вмісту металотіонеїнів у печінці жаби є показником ефективності антиоксидантного захисту за дії на організм іонів міді й цинку.

Робота виконувалась за підтримки МОН України в межах Спільного Українсько-Грецького науково-технічного проекту № М/65-2006 та Західноукраїнського біомедичного товариства.

ЛІТЕРАТУРА

1. Falfushynska H.I., Romanchuk L.D., Stolyar O.B. Different responses of biochemical markers in frogs (*Rana ridibunda*) from urban and rural wetlands to the effect of carbamate fungicide // *Compar. Biochem. Physiol.* – 2008. – **148C**, № 3. – P. 223-229.
2. Falfushynska H.I., Romanchuk L.D., Stolyar O.B. Seasonal and spatial comparison of metallothioneins in frog *Rana ridibunda* from feral populations // *Ecotoxicology.* – 2008. – **17**, № 8. – P. 781-788.
3. Naab F., Volcomirsky M., Burlon A. et al. Metabolic alterations without metal accumulation in the ovary of adult *Bufo arenarum* females, observed after long-term exposure to Zn(2+), followed by toxicity to embryos //

Arch. Environ. Contam. Toxicol. – 2001. – **41**. – P. 201-207.

4. Papadimitriou E.A., Loumbourdis N.S. Copper kinetics and hepatic metallothionein levels in the frog *Rana ridibunda*, after exposure to CuCl₂ // *Biometals.* – 2003. – **16**. – P. 271-277.

5. Roesijadi G. Metallothionein and its role in toxic metal regulation // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1996. – **113C**. – P. 117-123.

6. Stohs S.J., Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions // *Free Rad. Biol. Med.* – 1995. – **18**, № 2. – P. 321-336.

ВОЗМОЖНОЕ УЧАСТИЕ МЕТАЛЛОТИОНЕИНОВ ЛЯГУШКИ *RANA RIDIBUNDA* В АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЕ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ИОНОВ МЕДИ И ЦИНКА

Л.Д. Романчук, Г.И. Фальфушинская, О.Б. Столяр
ТЕРНОПОЛЬСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ВЛАДИМИРА ГНАТЮКА

Резюме

*Ионы меди и цинка в экологически реальных концентрациях угнетали Mn- и Cu,Zn-супероксиддисмутазную и каталазную активности в печени лягушки *Rana ridibunda*, однако только ионы цинка вызывали усиление образования супероксиданиона и перекисного окисления липидов, а также угнетение ацетилхолинэстеразной активности. Обсуждается роль Cu-металлотионеинов лягушки, содержание которых значительно увеличивалось при действии меди, но не цинка, в антиоксидантной защите.*

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **лягушка *Rana ridibunda*, оксидативный стресс, металлотионеины, медь, цинк.**

PROBABLE PARTICIPATION OF METALLOTHIONEINS OF FROG *RANA RIDIBUNDA* IN ANTIOXIDAN DEFENCE UNDER THE EFFECT OF COPPER AND ZINC IONS

L.D. Romanchuk, H.I. Falfushynska, O.B. Stoliar
TERNOPIL NATIONAL PEDAGOGICAL UNIVERSITY BY VOLODYMYR HNATIUK

Summary

*The ecologically realistic concentrations of copper and zinc ions caused the inhibition of the Mn- and Cu,Zn-superoxide dismutase and catalase activity in the liver of frog *Rana ridibunda*. However, only zinc ions provoked the activation of the superoxide anion formation and lipid peroxidation and also the inhibition of the acetylcholinesterase activity. The role of the Cu-metallothioneins in the antioxidant defence is discussed in connection with the particular elevation of their content in the tissue under the effect of copper but not of zinc.*

KEY WORDS: **frog *Rana ridibunda*, oxidative stress, metallothioneins, copper, zinc.**

Отримано 7.09.2009 р.

Адреса для листування: О.Б. Столяр, Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка, вул. М. Кривоноса, 2, Тернопіль, 46027, Україна.

ВПЛИВ ХЛОРИДУ КАДМІЮ НА СТАН МОНООКСИГЕНАЗНОЇ СИСТЕМИ ТА ІНТЕНСИВНІСТЬ ОКСИДАТИВНИХ ПРОЦЕСІВ У ТКАНИНАХ ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ

В.І. Падалко, І.С. Леонова, О.В. Козлова
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ В.Н. КАРАЗІНА

Досліджено вікові особливості стану монооксигеназної системи та інтенсивності оксидативних процесів у мікросомах і сироватці крові щурів при введенні $CdCl_2$. Отримані результати свідчать про те, що $CdCl_2$ може провокувати оксидативний стрес в організмі тварин, проте вікові особливості зміни активності монооксигеназної системи не можуть бути пояснені лише цим фактом.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: щури, монооксигеназна система, ксенобіотики, кадмій.

ВСТУП. Однією з головних сучасних проблем людства є забруднення довкілля ксенобіотиками, зокрема важкими металами. Серед металів одним із найнебезпечніших є кадмій, що залишається у центрі уваги екологів та токсикологів, а останнім часом і геронтологів [6]. У науковій літературі наведено багато інформації щодо механізмів токсичної дії кадмію на живі істоти, але стосовно вікових особливостей впливу металу існує невелика кількість даних. Проте вік тварин вважають важливим фактором при оцінці токсичності металів [7], визнається, що самі метали можуть відігравати певну роль в інтенсифікації старіння [9].

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. У роботі використовували щурів-самців лінії Вістар 2- та 14-місячного віку. Протягом 3 днів піддослідні тварини внутрішньочеревно отримували $CdCl_2$ у кількості 1,5 мг/кг маси тіла, щури контрольної групи одержували фізіологічний розчин. Усі маніпуляції зі щурами проводили відповідно до положень Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1985). Внутрішньочеревне введення розчинів та декапітацію тварин здійснювали під легким ефірним наркозом. Мікросомальну фракцію печінки та сироватку крові отримували загальновідомими методами. Вміст цитохромів b_5 та P-450 в ізольованих мікросомах визначали за методом [10]. Вимірювання п-гідроксилазної активності проводили, як описано [3], вмісту гідроперекисів

ліпідів у сироватці крові – за методом [4]. Окиснювальну деструкцію білків оцінювали, як описано у роботі [2]. Церулоплазмін визначали за методом [1], вміст білка у зразках – за методом [8]. Статистичну обробку результатів проводили з використанням t-критерію Стьюдента для малих вибірок і нормального розподілу.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Як неспецифічний інтегральний критерій оцінки статусу мікроелементів та для визначення ступеня адаптованості організму до дії важких металів часто використовують характеристику стану системи детоксикації ксенобіотиків печінки. Відомим є спосіб виявлення ранніх ознак їх токсичної дії на організм за визначенням активності цитохрому P-450 у зразках печінки [5]. Дослідження показали, що вміст мікросомальних гемопротейдів у контрольній групі тварин зростає з віком в 1,4 та 1,7 раза для цитохромів b_5 і P-450.

Введення $CdCl_2$ тваринам призводило до зменшення вмісту мікросомальних гемопротейдів вікозалежним чином. Так, вміст цитохрому b_5 більш суттєво знижувався у дорослих тварин (на 40 %) порівняно з молодими (22 %). Вміст цитохрому P-450 зменшувався у дорослих тварин на 54 %, у молодих – на 23 % (табл. 1).

Для оцінки загальної активності електронно-транспортної ферментної системи у цій роботі визначали анілінгідроксилазну (АГ) активність мікросом. Встановлено, що загальна активність монооксигеназної системи (МОГС) зменшувалась у щурів, які отримували $CdCl_2$: у молодих – на 18 %, у дорослих – на 42 % (табл. 1).

Таблиця 1 – Вплив CdCl₂ на вміст цитохромів b5, P-450 і активність анілінгідроксилази у мікросомах печінки щурів різного віку (нмоль/мг білка, n=9)

Показник		Вік тварин, міс.			
		2		14	
		контроль	дослід	контроль	дослід
Цитохром	b5	0,358±0,019	0,278±0,026	0,501±0,020 **	0,300±0,032 *
	P-450	0,448±0,042	0,345±0,015*	0,744±0,052 **	0,339±0,019 *
АГ		0,910±0,027	0,744±0,059 *	0,957±0,064	0,557±0,027 *

Примітка. * – p<0,05 – вірогідно порівняно з відповідним контролем; ** – p<0,05 – вірогідно порівняно з контролем 2 міс.

Враховуючи дані літератури щодо зв'язку негативної дії ряду ксенобіотиків, зокрема металів, з активацією стану т.зв. оксидативного стресу, в цій роботі проводили оцінку інтенсивності процесів перекисного окиснення ліпідів та пошкодження білків (за вмістом гідроперекисів ліпідів (ГПЛ) та карбонільних білків (КБ) у сироватці крові).

Встановлено, що введення CdCl₂ призвело до підвищення рівня ГПЛ в 1,45 раза у молодих та в 1,39 раза у дорослих тварин. Така ж тенденція спостерігалась і при вимірюванні рівня КБ у сироватці крові, але зростання рівня пошкоджених білків у молодих щурів було дещо більшим, ніж у дорослих, – в 1,47 та 1,26 раза відповідно (табл. 2).

Таблиця 2 – Вміст гідроперекисів ліпідів, карбонільних білків та церулоплазміну в сироватці крові щурів різного віку, які отримували CdCl₂ (n=6-9)

Показник	Вік тварин, міс.			
	2		14	
	контроль	дослід	контроль	дослід
ГПЛ, нмоль/мл	3,99±0,16	5,77±0,42*	3,18±0,31	4,41±0,37*
КБ, нмоль/мг білка	0,089±0,005	0,131±0,016*	0,085±0,004	0,107±0,006*
ЦП, нмоль/мл	1,231±0,085	1,684±0,083 *	2,071±0,118 **	1,089±0,058 *

Примітка. * – p<0,05 – вірогідно порівняно з відповідним контролем.

Визначення вмісту церулоплазміну (ЦП) – білка сироватки крові, який, як відомо, входить до складу антиоксидантної системи крові, показало, що введення CdCl₂ збільшувало вміст ЦП у молодих щурів на 37 %, проте така ж кількість ксенобіотика зменшувала вміст ЦП у дорослих тварин на 47 %.

Отримані дані свідчать про те, що зниження активності МОГС у печінці щурів може бути значною мірою зумовлене інтенсифікацією окиснювальних процесів, але цей зв'язок не є простим. Оскільки більш суттєве зниження активності МОГС у тварин дорослого віку спостерігалось на тлі практично однакового зростання процесів окиснення, можна вважати, що до впливу металу на рівень МОГС у дорослих щурів причетні як окиснювальний стрес, так і інші чинники, наприклад вищий ступінь зв'язування кадмію із SH-групами ферментів у цьому віці.

На певну увагу заслуговують отримані дані щодо різноспрямованої зміни вмісту ЦП у щурів

різного віку. Збільшення вмісту ЦП (що є не тільки складовою антиоксидантної системи крові, а й білком гострої фази, вміст якого зростає у плазмі при запаленні) у молодих тварин можна розглядати як певну реакцію на запалення, спричинену введенням ксенобіотика, проте зниження його рівня у дорослих щурів потребує додаткових досліджень.

ВИСНОВКИ. Встановлено, що зниження активності МОГС у печінці щурів може бути значною мірою зумовлене інтенсифікацією процесів вільнорадикального окиснення. Більш суттєве зниження активності МОГС у щурів дорослого віку на фоні практично однакового зростання вільнорадикальних процесів у 2- та 14-місячних тварин свідчить про можливість також іншого шляху дії металу в дорослих щурів, наприклад більшого ступеня зв'язування кадмію із SH-групами ферментів.

Робота підтримана Міністерством освіти та науки України (Договір М/348-2008).

ЛІТЕРАТУРА

1. Дубініна О.Ю. Окиснювальний стрес, окиснювальна модифікація білків // Мед. хімія. – 2001. – **3**, № 2. – С. 5-12.
2. Карузіна І.І., Арчаков А.І. Выделение микросомальной фракции печени и характеристика ее окислительных систем // Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. – С. 49-62.
3. Мжельская Т.И., Завалишин И.А., Иванова-Смоленская И.А. и др. Активность церулоплазмينا крови при прогрессирующих заболеваниях центральной нервной системы // Лаб. дело. – 1989. – № 11. – С. 12-16.
4. Asakawa T., Matsushita S. Coloring condition of thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxides // Lipids. – 1980. – **15**, № 3. – P. 137-140.
5. Iscan M. Comparison of in vitro effects of cadmium and nickel on the components of the liver microsomal drug metabolizing enzyme system of the guinea-pig // Comp. Biochem. Physiol. – 1985. – № 1. – P. 155-158.
6. Jarup L. Cadmium and its adverse effects on human health // Indian J. Med. Res. – 2008. – **128**. – P. 557-564.
7. Maljkovic T., Kostial K. The influence of age on metal foicity // Heavy Metals Environ. Int. Conf. – Athens Edinburg, 1985. – **2**. – P. 193-195.
8. Miller G.I. Protein determination for large numbers of samples // Anal. Chem. – 1959. – **31**, № 5. – P. 964-966.
9. Naughton D.P., Petroczi A. The metal ion theory of aging: dietary target hazard quotients beyond radicals // Immunity and Aging. – 2008. – **5**, № 3. – P. 876-879.
10. Omura T., Sato R. The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes. Solubilization, purification and properties // J. Biol. Chem. – 1964. – **239**, № 7. – P. 2379-2385.

ВЛИЯНИЕ ХЛОРИДА КАДМИЯ НА СОСТОЯНИЕ МОНООКСИГЕНАЗНОЙ СИСТЕМЫ И ИНТЕНСИВНОСТЬ ОКСИДАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ В ТКАНЯХ КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА

В.И. Падалко, И.С. Леонова, Е.В. Козлова
ХАРЬКОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ В.Н. КАРАЗИНА

Резюме

Проведено исследование возрастных особенностей состояния монооксигеназной системы и интенсивности окислительных процессов в микросомах и сыворотке крови крыс при введении $CdCl_2$. Полученные результаты свидетельствуют о том, что введение $CdCl_2$ в организм животных может провоцировать окислительный стресс, однако возрастные особенности изменения активности монооксигеназной системы не могут быть объяснены только этим фактом.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: крысы, монооксигеназная система, ксенобиотики, кадмий.

EFFECT OF CADMIUM CHLORIDE ON MONOOXYGENASE SYSTEM AND INTENSIVITY OF OXIDATIVE PROCESSES IN DIFFERENT-AGED RAT TISSUES

V.I. Padalko, I.S. Leonova, O.V. Kozlova
KHARKIV NATIONAL UNIVERSITY BY V.N. KARAZIN

Summary

The influence of $CdCl_2$ on monooxygenase system and intensivity of oxidative processes in microsomes and blood serum of rats of different age was investigated. The ability of $CdCl_2$ to provoke oxidative stress was shown, however, the age-depended changes of monooxygenase system should not be explain only from that point of view.

KEY WORDS: rats, monooxygenase system, xenobiotics, cadmium.

Отримано 14. 09. 2009 р.

Адреса для листування: В.І. Падалко, вул. Отокара Яроша, 47, кв. 104, Харків, 61077, Україна.

ОТРИМАННЯ РЕКОМБІНАНТНОГО ФЕРМЕНТУ АРГІНАЗИ І ЛЮДИНИ У ДРІЖДЖІВ ЯК ПРОТИПУХЛИННОГО ПРЕПАРАТУ

Б.Л. Білик^{1,2}, Ю.А. Ржепецький¹, О.С. Красовська¹, Н.О. Сибірна^{1,2}, О.В. Стасик¹

ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ КЛІТИНИ НАН УКРАЇНИ¹, ЛЬВІВ
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА²

З метою отримання ефективних продуцентів рекомбінантної аргінази І людини ген аргінази І, злитий з фактором секреції MF α дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, було клоновано у вектор експресії дріжджів *Hansenula polymorpha* під контролем сильного конститутивного промотора гена гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогенази (HrGAP). Для забезпечення мультикопійної інтеграції у геном штаму-реципієнта (подвійного делеційного мутанта *H. polymorpha* Δ car1 Δ ade1) та надсинтезу рекомбінантної аргінази вектор експресії містив ген дріжджів *Pichia pastoris* ADE1 як селективний маркер. В результаті було вперше отримано надпродуцент секреторної форми аргінази І людини на основі дріжджів. Оптимізація умов культивування дозволила досягти збільшення вмісту рекомбінантного білка у культуральному середовищі до 25 мг/л із високою питомою активністю 600 од./мг білка.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: рекомбінантний білок, аргіназа, протипухлинна терапія.

ВСТУП. Пошук нових ефективних, нетоксичних та селективних методів протипухлинної терапії, що базуються на фізіологічних особливостях злоякіснотрансформованих клітин, залишається актуальним завданням сучасної науки. Встановлено, що за умов зниження вмісту амінокислоти аргініну в організмі онкохворих з такими формами пухлин, як гепатокарциноми, меланоми та ін., суттєво гальмується їх ріст і має місце канцероцидний ефект внаслідок селективної індукції механізмів програмованої клітинної смерті (апоптозу) в пухлинних клітинах [3]. Ця фізіологічна особливість злоякіснотрансформованих клітин може бути використана для розробки ензимотерапії, яка ґрунтується на створенні дефіциту аргініну в кров'яному руслі пацієнтів шляхом введення препаратів рекомбінантних ферментів катаболізму аргініну, зокрема аргінази І людини. Гальмує застосування цього ферменту для лікування злоякісних новоутворень його висока вартість, оскільки поки що немає ефективних мікробних продуцентів даного ферменту.

Мета роботи – створення надпродуцентів аргінази І людини на основі дріжджів *H. polymorpha*, відомої платформи для експресії рекомбінантних білків медичного при-

значення [4], і підбір оптимальних умов для ефективної експресії та секреції рекомбінантного білка з високою питомою активністю.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. В роботі використовували штам дикого типу *H. polymorpha* NCYC 495 (leu1-1) та похідний мутант Δ car1 Δ ade1. Для вирощування клітин дріжджів при 37 °С застосовували середовища YNB (0,17 % Yeast Nitrogen Base, 0,25 % сульфат амонію, 1 % глюкоза); YNB з аргініном як єдиним джерелом азоту (100 мг/л) та багате середовище YPD (1 % пептон, 1 % дріжджовий екстракт, 1 % глюкоза). Усі генно-інженерні маніпуляції та електрофорез в ПААГ проводили відповідно до [6]. Концентрацію білка визначали за методом Лоурі. Питому активність аргінази визначали згідно з описаним методом [3].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Для отримання надпродуцента рекомбінантної аргінази І людини було використано штам-реципієнт Δ car1 з делетованим геном аргінази дріжджів, описаний нами раніше [2]. На першому етапі штам Δ car1 Δ ade1 було трансформовано вектором pHB7, що містив зливу послідовність гена аргінази І людини і сигналу секреції дріжджів *S. cerevisiae*, під контролем конститутивного промотора (HrGAP). Селекцію трансформантів проводили за ознакою відновлення росту на

© Б.Л. Білик, Ю.А. Ржепецький, О.С. Красовська, Н.О. Сибірна, О.В. Стасик, 2009.

середовищі з аргініном як єдиним джерелом азоту, яким можна забезпечити за допомогою експресії рекомбінантної аргінази людини. Дійсно, встановлено, що при надекспресії рекомбінантна аргіназа здатна забезпечувати утилізацію аргініну в трансформанти, хоча більша частина білка ефективно секретується

з клітини (дані не наведено). Отриману вибірку трансформантів було проаналізовано на предмет питомої активності аргінази у рідкому середовищі YPD, яка виявилась досить низькою. Так, у найкращого штаму-продуцента N6 активність секретованої аргінази становила 2 MOA/мл (рис. 1А).

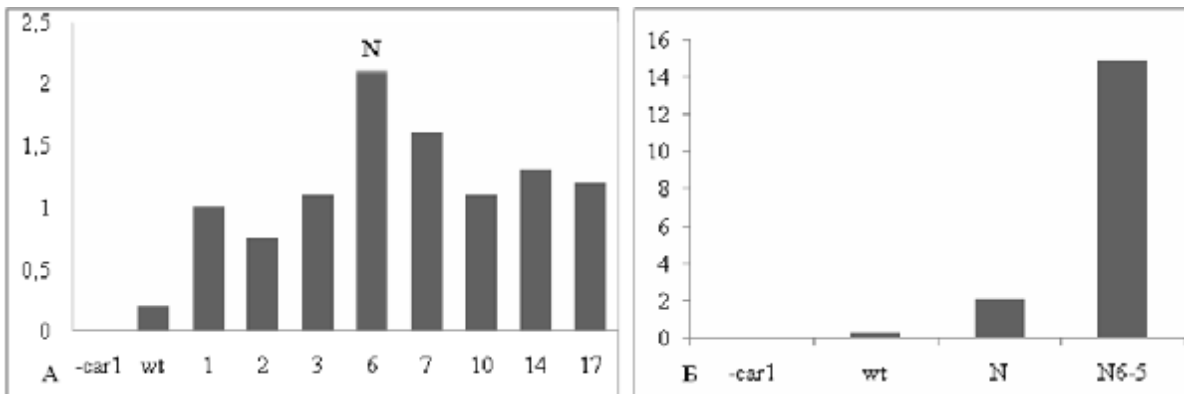


Рис. 1 А. Питома активність аргінази I людини (MOA/мл) в культуральному середовищі YPD після 48 год інкубації. wt – штам дикого типу; $\Delta car1$ – реципієнтний штам $\Delta car1\Delta ade1$; 1-17 – трансформанти штаму $\Delta car1\Delta ade1$ вектором pHV7. Б. Порівняння активності аргінази в культуральному середовищі отриманих продуцентів. N6 – найкращий продуцент серед трансформантів $\Delta car1\Delta ade1$ вектором pHV7; N6-5 – найкращий продуцент серед похідних штаму N6, трансформованого вектором мультікопійної інтеграції pHV9.

З метою підвищення синтезу цільового білка на наступному етапі було використано розроблену нами систему для мультікопійної інтеграції векторів у геном *H. polymorpha* [1]. Продуцент N6 було застосовано як реципієнт для трансформації вектором pHV9, що містив як селективний маркер, додатково до касети експресії секреторної аргінази, ген ADE1 *P. pastoris* під контролем вкороченого до 54 п.н. власного промотора. Селекцію трансформантів проводили за ознакою відновлення росту на мінімальному середовищі без аденіну. Для вибірки трансформантів було визначено питому активність аргінази в культуральному середовищі. Найвищу активність (15 MOA/мл) виявлено у трансформанта N6-5 (рис. 1Б). Отже, шляхом збільшення кількості копій касети експресії вдалось підвищити вихід цільового білка щонайменше у 7 разів. При цьому питома активність очищеного рекомбінантного ферменту становила 500-600 MOA/мг білка (буде описано в іншій публікації).

З метою оптимізації умов продукування рекомбінантної аргінази I людини штам N6-5 вирощували в різних модифікованих середовищах та аналізували вміст позаклітинного рекомбінантного білка (розміром 37 кДа) методом ПААГ електрофорезу (рис. 2).

Насамперед було проаналізовано вплив pH культурального середовища на ефек-

тивність синтезу рекомбінантної аргінази. Встановлено, що додавання трис-НСІ буфера (50 мМ, pH 7,5) є оптимальним з огляду на те, що pH оптимум ферментативної активності аргінази I становить 9,5, а значення pH 7,5 є максимально допустимим, при якому не спостерігається суттєве інгібування росту біомаси продуцента (рис. 2А). Зважаючи на те, що іон Mn^{2+} – кофактор аргінази, було зроблено припущення, що його підвищена концентрація у культуральному середовищі може бути важливим фактором для стабілізації ферменту. Додавання $MnCl_2$ в концентрації 1 мМ призвело до суттєвого збільшення вмісту рекомбінантної аргінази (рис. 2А), окрім цього, спостерігалось зростання активності ферменту приблизно у п'ять разів. Підвищення концентрації глюкози в середовищі до 2 г/л було необхідне для того, щоб збільшити вихід біомаси продуцента і титр секретованого ферменту, що власне і спостерігалось (рис. 2Б). Концентрацію дріжджового екстракту і пептону було знижено з метою здешевлення культурального середовища, проте це призвело до суттєвого зменшення виходу ферменту (рис. 2Б). Також перевірено, чи додавання сироваткового альбуміну (BSA) стабілізуватиме рекомбінантну аргіназу в позаклітинному середовищі, чи зменшить її деградацію. Як видно з рисунка 2Б, додавання BSA в концен-

трації 10 мг/л практично не впливало на концентрацію білка аргінази, а також її питому активність (дані не наведено). Встановлено, що використання альтернативних джерел вуг-

лецю в середовищі (наприклад метанол, сахароза) або альтернативного промотора експресії також не призводило до збільшення виходу цільового білка (дані не наведено).

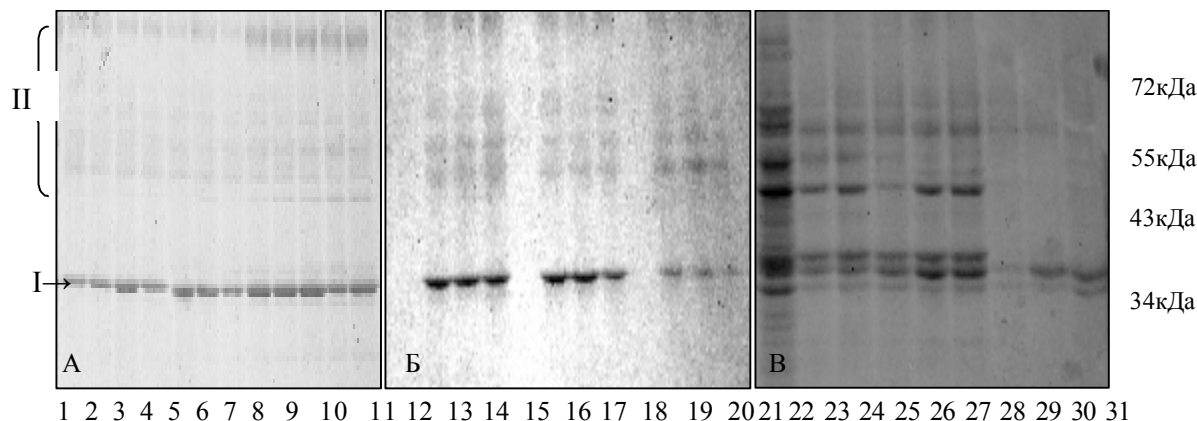


Рис. 2. ПААГ електрофорез зразків культурального середовища продуцента аргінази N6-5, інкубованого у модифікованих середовищах YPD з додаванням трис-НСІ буфера (50 мМ, рН 7,5). Нанесено по 20 мкл культурального середовища. А. 1-6 – YPD, 1-6 доби; 7-12 – YPD, 1 мМ MnCl₂, 1-6 доби. Б. 13-15 – YPD (2 % глюкози), 1 мМ MnCl₂, 1-3 доби; 16-18 – YPD, 1 мМ MnCl₂, 1 мг/л BSA, 1-3 доби; 19-21 – YPD (0,5 % пептон; 0,5 % дріжджовий екстракт), 1 мМ MnCl₂, 1-3 доби. В. 22-24 – YPD (2 % глюкози), 1 мМ MnCl₂, 30 °С, 1-3 доби; 25-27 – YPD (2 % глюкози), 1 мМ MnCl₂, 37 °С, 1-3 доби; 28-30 – YPD (2 % глюкози), 1 мМ MnCl₂, 45 °С, 1-3 доби; 31 – білкові стандарти. I – аргіназа I, II – контамінуючі білки.

Очевидною проблемою при продукуванні секреторної аргінази у модифікованому середовищі була поява контамінуючих секреторних дріжджових білків, зумовлена підвищенням значенням рН та присутністю іонів марганцю (рис. 2), оскільки ці білкові продукти не визначались при інкубації штаму продуцента у стандартному середовищі YPD (дані не наведено). Аргіназа I є термостабільним ферментом, тому ми зробили припущення, що підвищення температури інкубації дозволить позбутись або, принаймні, зменшити концентрацію контамінуючих секреторних білків. Було з'ясовано, що найменший вміст даних продуктів у культуральному середовищі спостерігається при 45 °С, проте і концентрація аргінази в даному сере-

довищі є суттєво нижчою порівняно з культивуванням при фізіологічній для *H. polymorpha* температурі (37 °С).

ВИСНОВКИ. Сконструйовано вектори експресії та вперше отримано ефективний над-продуцент секреторної аргінази I людини на основі метилотрофних дріжджів *H. polymorpha*. Оптимізовано умови інкубації продуцента для забезпечення ефективної секреції аргінази I людини та її стабільності у культуральному середовищі, що дозволило досягти вмісту каталітично активного рекомбінантного білка до 25 мг/л.

Робота виконана за підтримки гранту О.С.К. Західноукраїнського біомедичного центру.

ЛІТЕРАТУРА

1. Красовська О.С., Федосюк С.П., Стасик О.В., Сибірний А.А.. Нова система селекції мультикопійних інтегрантів у дріжджів *Hansenula polymorpha* на основі аукоотрофного та ензиматичного маркерів // Збірник наукових праць "Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології" з'їзду Українського товариства генетиків та селекціонерів. – Алушта, 2007. – 1. – С. 355-359.
2. Нагорний В.О., Фаюра Л.Р., Борецький Ю.Р. та ін. Розробка платформи для надекспресії та оптимізації кінетичних властивостей аргіназ на основі метилотрофних дріжджів *Hansenula polymorpha* // Збірник наукових праць "Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології" з'їзду Українсь-

- кого товариства генетиків та селекціонерів. – Алушта, 2007. – 1. – С. 366-371.
3. Davis R.H., Mora J. Mutants of *Neurospora crassa* deficient in ornithine-delta-transaminase // *J Bacteriol.* – 1968. – 96, № 2. – P. 383-388.
4. Feun L., You M., Wu C.J. Arginine deprivation as a targeted therapy for cancer // *Curr. Pharm. Des.* – 2008. – 14, № 11. – P. 1049-1057.
5. Gellissen G. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2000. – 54. – P. 741-750.
6. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. // Cold Spring Harbor. – NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. – P. 2049.

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ФЕРМЕНТА АРГИНАЗЫ I ЧЕЛОВЕКА У ДРОЖЖЕЙ КАК ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ПРЕПАРАТА

Б.Л. Билык^{1,2}, Ю.А. Ржепецкий¹, О.С. Красовская¹, Н.О. Сибирная^{1,2}, О.В. Стасык¹
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ КЛЕТКИ НАН УКРАИНЫ¹, ЛЬВОВ
ЛЬВОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ИВАНА ФРАНКО²

Резюме

С целью получения эффективных продуцентов рекомбинантной аргиназы I человека ген аргиназы I, слитый с фактором секреции MF α дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, был клонирован в вектор экспрессии дрожжей *Hansenula polymorpha* под контролем сильного конститутивного промотора гена глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (HpGAP). Для обеспечения мультикопийной интеграции в геном штамма-реципиента (двойного делеционного мутанта *H. polymorpha* $\Delta car1 \Delta ade1$) и надсинтеза рекомбинантной аргиназы вектор экспрессии нес ген дрожжей *Pichia pastoris* ADE1 как селективный маркер. В результате был впервые получен надпродуцент секреторной формы аргиназы I человека на основе дрожжей. Оптимизация условий культивирования позволила достичь увеличения содержания рекомбинантного белка в культуральной среде до 25 мг/л с высокой удельной активностью 600 ед./мг белка.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: рекомбинантный белок, аргиназа, противоопухолевая терапия.

PRODUCTION OF THE RECOMBINANT HUMAN ARGINASE I ON THE BASIS OF YEASTS AS AN ANTITUMOR AGENT

B.L. Bilyk^{1,2}, Yu.A. Rzhepetsky¹, O.S. Krasovska¹, N.O. Sybirna^{1,2}, O.V. Stasyk¹
INSTITUTE OF CELL BIOLOGY, NAS OF UKRAINE¹, LVIV
LVIV NATIONAL UNIVERSITY BY I. FRANKO²

Summary

With the aim to obtain the efficient producers of recombinant human arginase I, its gene fused with the secretion factor MF α of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* was cloned into the expression vector of the yeast *Hansenula polymorpha* under control of strong constitutive promoter of the gene of glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (HpGAP). To provide multicopy integration into the genome of recipient strain (*H. polymorpha* double deletion mutant $\Delta car1 \Delta ade1$), expression vector harbored beside of the arginase expression cassette also the yeast *Pichia pastoris* ADE1 gene as a selectable marker. As a result, overproducer of secreted form of human arginase I was isolated for the first time. Optimization of cultivation conditions allowed to achieve an increase in arginase yield in cultural liquid up to 25 mg/l with high specific activity of 600 U/mg protein.

KEY WORDS: recombinant protein, arginase, anticancer therapy.

Отримано 24.09.2009 р.

Адреса для листування: Ю.А. Ржепецкий, Інститут біології клітини НАН України, вул. Драгоманова, 14/16, Львів, 79005, Україна.

ТКАНИНОСПЕЦИФІЧНІ ЗМІНИ ВМІСТУ НІТРИТІВ ТА НІТРАТІВ У ЩУРІВ ЗА УМОВ РАБДОМІОЛІЗУ НА ФОНІ ПОПЕРЕДНЬОГО ВВЕДЕННЯ L-АРГІНІНУ ТА Zn-ПРОТОПОРФІРИНУ

В.П. Филимоненко

ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ В.Н. КАРАЗІНА

Введення гліцеролу спричиняє накопичення нітратів у сироватці крові та нітритів у легенях, а також зниження вмісту обох показників у судинах щурів. Попереднє введення L-аргініну призводить до підвищення рівня нітратів в серці та не впливає на зміни в сироватці, судинах та легенях. Введення Zn-протопорфірину викликає більш виражене зростання вмісту нітратів в сироватці та зменшення рівня нітритів і нітратів у судинах.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: нітрити, нітрати, гліцерол, L-аргінін, Zn-протопорфірин.

ВСТУП. Відомо, що рабдоміоліз (руйнування міоцитів) супроводжується накопиченням гемму у крові та його надходженням до тканин [2]. Надлишок гемму викликає активацію вільнорадикальних процесів та індукцію ферменту деградації гемму гемоксигенази. За умов стресу також відбуваються порушення утворення оксиду азоту. Гем-гемоксигеназна та L-аргінін-NO-синтазна системи тісно взаємопов'язані. Але система оксиду азоту в умовах рабдоміолізу на фоні попередньої активації або інгібування гемоксигеназ недостатньо вивчена.

У зв'язку з цим метою даної роботи було дослідити вміст стабільних метаболітів NO (нітритів та нітратів) у тканинах щурів за рабдоміолізу на фоні попереднього введення L-аргініну та інгібітора гемоксигеназ Zn-протопорфірину.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проводили на самцях щурів лінії Вістар масою 180-250 г. Рабдоміоліз відтворювали шляхом ін'єкції 50 % водного розчину гліцеролу в дозі 1 мл/100 г маси тіла по $1/2$ дози в кожний стегновий м'яз. За 0,5 год до гліцеролу вводили L-аргінін внутрішньоочеревинно та Zn-протопорфірин (Zn-ПП) підшкірно в дозах 60 мг і 2 мг/100 г маси тіла відповідно. Контрольним тваринам вводили відповідний об'єм фізіологічного розчину. Тварин декапітували під легким ефірним наркозом через 24 год після ін'єкції гліцеролу. Об'єктами дослідження були сироватка крові і гомогенати судин, серця та легень.

© В.П. Филимоненко, 2009.

Вміст нітритів визначали з використанням реактиву Гріса [3]. Вміст нітратів визначали бруциновим методом [1]. Вміст білка визначали методом Лоурі в модифікації Міллера. Результати обробляли статистично.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Вміст нітритів у сироватці не відрізняється від контрольних значень в жодній з дослідних груп щурів (табл. 1). Проте рівень нітратів збільшується в 2,4 раза після ін'єкції гліцеролу та сумісного введення L-аргініну та гліцеролу. Блокування гемоксигеназ призводить до подальшого зростання цього показника. Підвищення сумарного пулу метаболітів NO, ймовірно, є наслідком активації iNOS в умовах стресу [1]. Під час накопичення вільних радикалів нітрати швидко утворюються з нітритів, що викликає підвищення рівня саме цих сполук.

У судинах спостерігаються однакова динаміка зменшення рівнів NO_2^- та NO_3^- після впливів – до 67 % порівняно з контролем після ін'єкції гліцеролу та попереднього введення L-аргініну та більш виражене зниження (до 49 %) після введення Zn-ПП. Отримані результати узгоджуються з даними роботи [4] про системну гіпертензію та відсутність впливу попереднього введення донорів NO на пригнічену вазодилаторну функцію судин у тварин з рабдоміолізом. Автори вважають, що за цих умов весь оксид азоту, що утворюється, перехоплюється гемоглобіном лізованих еритроцитів. З іншого боку, зниження вмісту NO у судинах корелює з накопиченням NO_3^- у сироватці. Отже, ймовірно, оксид азоту вивільнюється до кровотоку внаслідок пошкоджен-

Таблиця 1 – Вміст нітритів та нітратів у тканинах (мкг/мл сироватки чи мг білка) після введення гліцеролу (Гл) та на фоні введення L-аргініну (А) і Zn-протопорфірину ($M \pm s$, $n=4-11$)

Тканина	Показник							
	Нітрити				Нітрати			
	Конт- роль	Гл	А+Гл	Zn-ПП+А+Гл	Конт- роль	Гл	А+Гл	Zn-ПП+А+Гл
Сироватка	9,08±1,53	8,68±1,34	8,39±1,30	9,78±0,90	950±190	2250±220*	2090±210*	2990±690* ^a
Судини	1,55±0,11	1,26±0,1*	1,07±0,3*	0,89±0,2* ^a	44,7±12,6	27,5±7,9*	24,8±6,4*	17,7±4* ^a
Серце	0,33±0,04	0,34±0,06	0,32±0,07	0,34±0,07	17,6±3,4	17±3,2	28,1±8,8*	22,8±6,8*
Легені	0,31±0,06	0,46±0,1*	0,45±0,12*	0,47±0,08*	23,2±6,5	19,3±5,6	24,6±7,5	17,4±5,8

Примітка. * – $p < 0,05$ відносно контролю, ^a – $p < 0,05$ відносно "А+Гл".

ня судинної стінки активними формами кисню, а Zn-ПП підсилює цей процес.

У серці рівень нітритів не змінюється після жодного з впливів. Вміст нітратів підвищується за попереднього введення L-аргініну та залишається на такому рівні й на фоні ін'єкції Zn-ПП. Згідно з літературними даними, зростання NO_3^- може бути пов'язане зі стимуляцією конститутивних ізоформ NOS екзогенним введенням L-аргініну [1].

У легенях сумарний пул метаболітів NO збільшується в усіх дослідних групах за рахунок зростання частки нітритів, що, ймовірно,

обумовлено транскрипційною активацією iNOS у відповідь на оксидативний стрес.

ВИСНОВКИ. Введення гліцеролу викликає тканиноспецифічні зміни вмісту метаболітів NO у сироватці, судинах та легенях. Попереднє введення L-аргініну не впливає на ці зміни і призводить до накопичення нітратів у серці. Пригнічення гемоксигеназної активності поглиблює зміни, спричинені гліцеролом у сироватці й судинах, та не впливає на зміни в серці та легенях.

ЛІТЕРАТУРА

1. Сагач В.Ф., Базілюк О.В., Степаненко Л.Г. та ін. Вплив еналаприлу на синтез оксиду азоту, окисний метаболізм і тонус судин у старих щурів // Фізіол. журн. – 2007. – **53**, № 4. – С. 15-26.
2. Филимоненко В.П., Никитченко И.В., Калиман П.А. Антиоксидантные эффекты L-аргинина в сердце крыс при экспериментальном рабдомиолизе // Укр. біохім. журн. – 2009. – **81**, №1. – С.114-121.

3. Green L.C., Wagner D.A., Glogovski J. et al. Analysis of nitrate, nitrite and [^{15}N]nitrate in biological fluids // Annal. Biochem. – 1982. – **126**. – P. 131-138.
4. Warden D.H., Croatt A.J., Katusic Z.S., Nath K.A. Characterization of acute reversible systemic hypertension in a model of heme protein-induced renal injury // Am. J. Physiol. Renal Physiol. – 1999. **277**, № 1. – P. 58-65.

ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ НИТРИТОВ И НИТРАТОВ У КРЫС ПРИ РАБДОМИОЛИЗЕ НА ФОНЕ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ L-АРГИНИНА И Zn-ПРОТОПОРФИРИНА

В.П. Филимоненко
ХАРЬКОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ В.Н. КАРАЗИНА

Резюме

Введение глицерола вызывает накопление нитратов в сыворотке крови и нитритов в легких, а также снижение уровня обоих показателей в сосудах крыс. Предварительное введение L-аргинина приводит к

повышению уровня нитратов в сердце и не влияет на изменения в сыворотке, сосудах и легких. Введение Zn-протопорфина вызывает более выраженное увеличение уровня нитратов в сыворотке и уменьшение уровня метаболитов NO в сосудах.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: нитриты, нитраты, глицерол, L-аргинин, Zn-протопорфирин.

TISSUE-SPECIFIC CHANGES OF RAT NITRITES AND NITRATES CONTENT DURING RHABDOMYOLYSIS UNDER PRETREATMENT BY L-ARGININE AND Zn-PROTOPORPHYRIN

V.P. Fylymonenko

KHARKIV NATIONAL UNIVERSITY BY V.N. KARAZIN

Summary

The glycerol administration causes the accumulation of nitrates in rat blood serum, nitrites in lungs and decreases the content of both parameters in rat vessels. Pretreatment by L-arginine stimulates the elevation of nitrates in heart and doesn't influence on the changes in serum, vessels and lungs. The Zn-protoporphyrin injection causes the more significant increase of nitrates content in serum and the decrease of nitrites and nitrates in vessels.

KEY WORDS: nitrites, nitrates, glycerol, L-arginine, Zn-protoporphyrin.

Отримано 15.09.2009 р.

Адреса для листування: В.П. Филимоненко, Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, 61077, Україна.

ВПЛИВ ЦОГ/ЛОГ БЛОКАТОРІВ НА ПРОЦЕСИ ЛІПОПЕРОКСИДАЦІЇ У СЛИЗОВІЙ ОБОЛОНЦІ ШЛУНКА ТА ТКАНИНИ СЕРЦЯ ЩУРІВ

І.С. Фоменко, Т.І. Бондарчук

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

В експериментах на щурах упродовж двох тижнів досліджували вплив інгібування ЦОГ-2 та поєднаного блокування ЦОГ/ЛОГ у СОШ і тканині серця на процеси ліпопероксидації. Виявили, що селективне блокування ЦОГ-2 спричинило посилення процесів ліпопероксидації у тканині серця, тоді як інгібування ЦОГ/ЛОГ похідними тіазолідинів меншою мірою впливало на вільнорадикальні процеси у цій тканині. При цьому концентрація МДА у СОШ мала тенденцію до зниження при дії усіх досліджуваних інгібіторів. Активність ензимів антиоксидантної системи (каталази та СОД) зростала за умов блокування ЦОГ/ЛОГ. Похідні тіазолідинів проявляють антиоксидантні та протизапальні властивості, що є підґрунтям для їх використання при лікуванні різних захворювань запального характеру.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: циклооксигеназа, ліпооксигеназа, ліпопероксидація, нітрогену оксид, слизова оболонка шлунка, тканина серця.

ВСТУП. На сьогодні для лікування чисельних запальних станів використовують нестероїдні протизапальні засоби (НПЗЗ) – інгібітори циклооксигенази (ЦОГ), що блокують синтез простагландинів – медіаторів запальних реакцій. Проте їх застосування може викликати різні побічні ефекти, що проявляються, головним чином, з боку травного тракту та серцево-судинної системи [4].

Гастротоксичні ефекти НПЗЗ є результатом інгібування простагландинів (головним чином PGE_2), які синтезуються конститутивною ізоформою ензиму – ЦОГ-1 [6]. Вони за фізіологічних умов регулюють секрецію, процеси міжклітинної комунікації, проліферації клітин слизової оболонки травного тракту. Відомо, що гастротоксичністю володіє більшість неселективних (стандартних) НПЗЗ. Натомість з використанням селективних інгібіторів ЦОГ-2 пов'язують імовірність зростання ризику захворювань серцево-судинної системи [7].

Ліпооксигеназний (ЛОГ) шлях обміну арахідонової кислоти також відіграє важливу роль у запаленні. Його продукти – лейкотрієни та ліпоксини задіяні у процесах активації лейкоцитів та їх адгезії до судинної стінки [8]. Також відомо, що вони беруть безпосередню участь в розвитку ульцерогенних змін у слизовій оболонці шлунка. Враховуючи вищесказане, препарати – похідні тіазолідинів, мають властивість поєднано інгібувати активність ЦОГ та ЛОГ, що

може мати значні переваги перед НПЗЗ, оскільки вони проявляють більш широкий спектр протизапальної дії [1].

У зв'язку з цим, метою дослідження було порівняння змін вмісту NO та продуктів ліпопероксидації, активності ензимів антиоксидантного захисту в слизовій оболонці шлунка (СОШ) та тканині серця (ТС) за умов двотижневого введення інгібітора ЦОГ-2 – целекоксиду та похідних тіазолідинів – препаратів, що володіють поєднаною інгібуючою ЦОГ/ЛОГ активністю: {2,5-діоксо-3-[4-оксо-5-(3-феніл-ариліден)-2-тіоксо-тіазолідин-3-іл]-піролідин-1-іл}-ацетатної кислоти та 4-{2,5-діоксо-3-[4-оксо-5-(3-феніл-ариліден)-2-тіоксо-тіазолідин-3-іл]-піролідин-1-іл}-бензен-сульфонамиду.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди проводили на 27 білих щурах масою 200-250 г, котрі були поділені на 4 групи: 1-ша (контрольна) – тварини, яким протягом двох тижнів перорально вводили фізіологічний розчин; 2-га – тварини, яким перорально вводили упродовж 14 днів інгібітор ЦОГ-2 – целекоксид (10 мг/кг), 3-тя – тварини, яким перорально вводили упродовж 14 днів {2,5-діоксо-3-[4-оксо-5-(3-феніл-ариліден)-2-тіоксо-тіазолідин-3-іл]-піролідин-1-іл}-ацетатну кислоту (10 мг/кг), 4-та – {2,5-діоксо-3-[4-оксо-5-(3-феніл-ариліден)-2-тіоксо-тіазолідин-3-іл]-піролідин-1-іл}-бензен-сульфонамід (10 мг/кг). Активність процесів ліпопероксидації вивчали за вмістом малонового діальдегіду (МДА) [5], активність

ензимів антиоксидантного захисту – за визначенням супероксиддисмутази [3], каталази [2], вміст оксиду азоту (NO) – за допомогою реактиву Гріса [9].

Статистичну обробку експериментальних результатів проводили з використанням прикладної програми ANOVA "Statistica". Статистично достовірними вважали розбіжності при $p < 0,05$. Всі дослідження були виконані згідно з правилами, передбаченими Європейською комісією з нагляду за проведенням лабораторних дослідів за участю експериментальних тварин.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Інгибування ЦОГ-2 целекоксибом спричинило підвищення концентрації МДА у тканині серця на 37 %, що вказувало на посилення процесів ліпопероксидації (рис. 1). Вміст МДА у тканині серця був також більшим за контрольні величини при застосуванні {2,5-діоксо-3-[4-оксо-5-(3-феніл-ариліден)-2-тіоксо-тіазолідин-3-іл]-піролідин-1-іл}-ацетатної кислоти та 4-{2,5-діоксо-3-[4-оксо-5-(3-феніл-ариліден)-2-тіоксо-тіазолідин-3-іл]-піролідин-1-іл}-бензен-сульфонамід, проте меншою мірою, ніж при використанні целекоксибу (на 28 та 30 % відповідно). Концентрація МДА у СОШ залишалась практично незмінною при дії цих трьох типів інгібіторів.

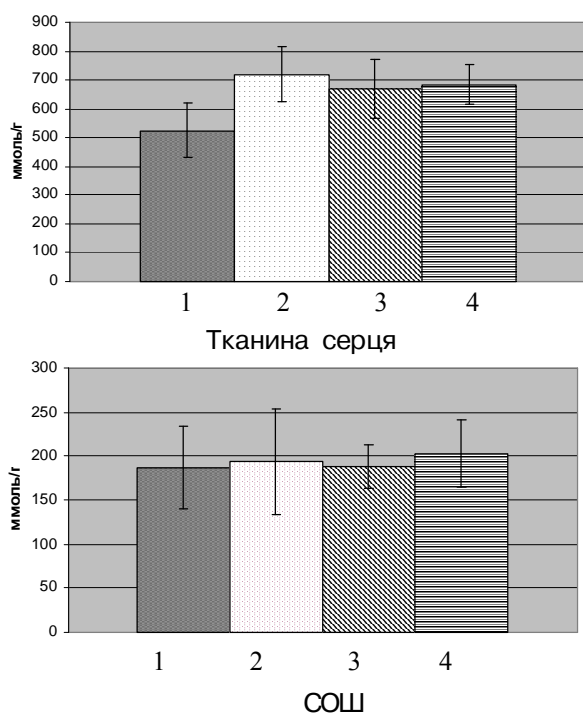


Рис. 1. Концентрація МДА у СОШ та тканині серця за умов: 1 – норми; 2 – введення целекоксибу; 3 – введення 2,5-діоксо-3-[4-оксо-5-(3-феніл-ариліден)-2-тіоксо-тіазолідин-3-іл]-піролідин-1-іл}-ацетатної кислоти; 4 – введення {2,5-діоксо-3-[4-оксо-5-(3-феніл-ариліден)-2-тіоксо-тіазолідин-3-іл]-піролідин-1-іл}-бензен-сульфонамід (10 мг/кг).

Концентрація NO зростала на 21 % у ТС при блокуванні ЦОГ-2, тоді як 4-{2,5-діоксо-3-[4-оксо-5-(3-феніл-ариліден)-2-тіоксо-тіазолідин-3-іл]-піролідин-1-іл}-бензен-сульфонамід підвищував вміст NO тільки на 7 % (рис. 2).

У СОШ концентрація NO практично не змінювалась під впливом дії целекоксибу. Поєднане блокування ЦОГ/ЛОГ призводило до значного збільшення вмісту NO у даній тканині (на 40 та 22 %). Ці зміни системи супроводжувались зростанням концентрації L-Arg у плазмі крові.

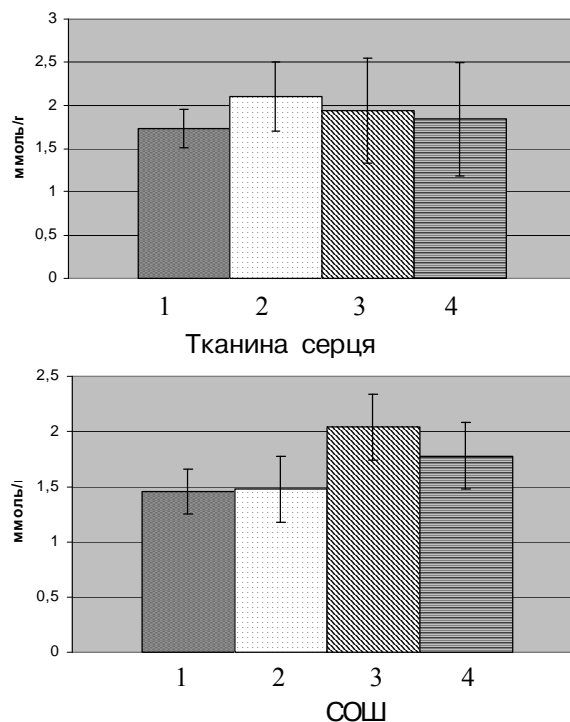


Рис. 2. Вміст NO у СОШ та тканині серця за умов: 1 – норми; 2 – введення целекоксибу; 3 – введення 2,5-діоксо-3-[4-оксо-5-(3-феніл-ариліден)-2-тіоксо-тіазолідин-3-іл]-піролідин-1-іл}-ацетатної кислоти; 4 – введення {2,5-діоксо-3-[4-оксо-5-(3-феніл-ариліден)-2-тіоксо-тіазолідин-3-іл]-піролідин-1-іл}-бензен-сульфонамід (10 мг/кг).

Інгибування ЦОГ-2, як і подвійне інгибування ЦОГ/ЛОГ, призводило до зростання активності ензимів антиоксидантного захисту (каталази та СОД) в обидвох досліджуваних тканинах. Введення целекоксибу зумовлювало підвищення активності каталази у ТС на 28 %, у СОШ – на 26 %, {2,5-діоксо-3-[4-оксо-5-(3-феніл-ариліден)-2-тіоксо-тіазолідин-3-іл]-піролідин-1-іл}-ацетатна кислота збільшувала активність каталази у ТС на 24 %, у СОШ – на 29 %, 4-{2,5-діоксо-3-[4-оксо-5-(3-феніл-ариліден)-2-тіоксо-тіазолідин-3-іл]-піролідин-1-іл}-бензен-сульфонамід призводив до зростання каталазної активності у ТС на 20 %, у СОШ – на 23 % (рис. 3).

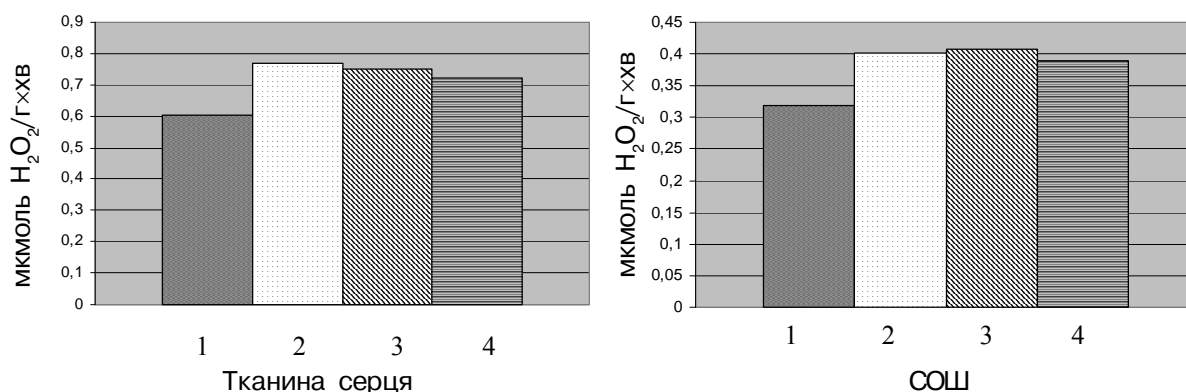


Рис. 3. Активність каталази у СО₂ та тканині серця за умов: 1 – норми; 2 – введення целекоксибу; 3 – введення 2,5-діоксо-3-[4-оксо-5-(3-феніл-ариліден)-2-тіоксо-тіазолідин-3-іл]-піролідин-1-іл]-ацетатної кислоти; 4 – введення 2,5-діоксо-3-[4-оксо-5-(3-феніл-ариліден)-2-тіоксо-тіазолідин-3-іл]-піролідин-1-іл]-бензен-сульфонамід (10 мг/кг).

ВИСНОВКИ. Інгібування ЦОГ-2 целекоксибом призводило до зростання інтенсивності процесів ліпопероксидації у тканині серця, що могло бути результатом його тромботичної дії. Активність ензимів антиоксидантної системи підвищувалась за таких умов. Зміни, що спостерігались внаслідок тривалого блокування ЦОГ/ЛОГ, були менш відчутними в обид-

вох досліджуваних тканинах порівняно з дією целекоксибу. Володіючи самостійними антиоксидантними властивостями, препарати – похідні тіазолідинів підвищували активність ензимів антиоксидантного захисту. Одержані результати можуть бути використані як підґрунтя для наступних преклінічних досліджень.

ЛІТЕРАТУРА

1. Зіменковський Б.С., Лесик Р.Б. 4-Тіазолідони. Хімія, фізіологічна дія, перспективи. – Вінниця: НОВА КНИГА, 2004. – 106 с.
2. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16-19.
3. Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева И.В. Простой и чувствительный метод определения активности СОД // Вопросы медицинской химии. – 1990. – № 2. – С. 88-91.
4. Скляр О.Я., Фоменко І.С. Нестероїдні протизапальні засоби, механізм їх дії, особливості застосування // Практична медицина. – 2007. – **14**, № 3. – С. 123-132.
5. Тимирбулатов Р.А., Селезнев Е.И. Метод повышения свободнорадикального окисления литийсодержащих компонентов крови и его диагностическое значение // Лаб. дело. – 1981. – № 4. – С. 209-211.
6. Abdel-Tawab M., Zetti H., Schubert-Zsilavec M. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: a critical review on current concepts applied to reduce gastrointestinal toxicity // Curr. Med. Chem. – 2009. – **16**, № 16. – P. 2042-2063.
7. Chaiamnuay S., Allison J.J., Curtis J.R. Risks versus benefits of cyclooxygenase-2-selective nonsteroidal anti-inflammatory drugs // American Journal of Health-System Pharmacy. – 2006. – **63**, № 19. – P. 1837-1851.
8. Geronikaki A.A., Lagunin A.A. Computer-Aided Discovery of Anti-Inflammatory Thiazolidinones with Dual Cyclooxygenase/Lipoxygenase Inhibition // Med. Chem. – 2008. – **51**, № 6. – P. 1601-1609.
9. Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids // Anal. Biochem. – 1982. – **126**. – P. 131-138.

Висловлюємо вдячність професору кафедри фармацевтичної, органічної і біоорганічної хімії Лесику Р.Б. за люб'язно надані препарати (2,5-діоксо-3-[4-оксо-5-(3-феніл-ариліден)-2-тіоксо-тіазолідин-3-іл]-піролідин-1-іл]-ацетатну кислоту та 4-{2,5-діоксо-3-[4-оксо-5-(3-феніл-ариліден)-2-тіоксо-тіазолідин-3-іл]-піролідин-1-іл}-бензен-сульфонамід) для проведення досліджень.

ВЛИЯНИЕ ЦОГ/ЛОГ БЛОКАТОРОВ НА ПРОЦЕССЫ ЛИПОПЕРОКСИДАЦИИ В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ЖЕЛУДКА И ТКАНИ СЕРДЦА КРЫС

И.С. Фоменко, Т.И. Бондарчук

ЛЬВОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ДАНИЛА ГАЛИЦКОГО

Резюме

В экспериментах на крысах на протяжении двух недель исследовали влияние ингибирования ЦОГ-2 и одновременного блокирования ЦОГ/ЛОГ в СОШ и ткани сердца на процессы липопероксидации. Обнаружили, что селективное блокирование ЦОГ-2 усилило процессы липопероксидации в ткани сердца, тогда как ингибирование ЦОГ/ЛОГ производными тиазолидинов меньшей мерой влияло на свободнорадикальные процессы в этой ткани. При этом концентрация МДА в СОШ проявляла тенденцию к снижению при действии всех исследуемых ингибиторов. Активность ферментов антиоксидантной системы (каталазы и СОД) возрастала при блокировании ЦОГ/ЛОГ. Производные тиазолидинов проявляют антиоксидантные и противовоспалительные свойства, которые являются почвой для их использования при лечении различных заболеваний воспалительного характера.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: циклооксигеназа, липооксигеназа, липопероксидация, оксид азота, слизистая оболочка желудка, ткань сердца.

INFLUENCE OF COX/LOX BLOCKERS ON LIPOPEROXIDATION PROCESSES IN GASTRIC MUCOSA AND HEART TISSUE OF RATS

I.S. Fomenko, T.I. Bondarchuk

LVIV NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY BY DANYLO HALYTSKY

Summary

In experiments on rats, the influence of COX-2 blockage and dual COX/LOX inhibition in gastric mucosa and heart tissue was investigated during two weeks. It was detected that selective COX-2 blockage caused an intensification of lipoperoxidation processes in the heart tissue, whereas dual COX/LOX inhibition, by thiazolidin-derivatives had less marked influence on free radical processes in this tissue. Moreover, MDA concentration in gastric mucosa had tendency to increase under the action of all investigated inhibitors. Inhibition of COX-2 as well as COX/LOX dual inhibition led to the increase of the antioxidant protection system enzymes activity (catalase, SOD) in both investigated tissues. Thiazolidin-derivatives has antioxidant and anti-inflammatory properties and it can be the background for their use in the treatment of different inflammatory diseases.

KEY WORDS: cyclooxygenase, lipooxygenase, lipoperoxidation, nitric oxide, gastric mucosa, heart tissue.

Отримано 17.09.2009 р.

Адреса для листування: І.С. Фоменко, Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, вул. Пекарська, 69, Львів, 79010, Україна.

ТКАНИННА СПЕЦИФІКА АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ ТОЛЕРАНТНОГО ДО ГІПОКСІЇ ОРГАНІЗМУ

Г.І. Фальфушинська

ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ ПЕДАГОГІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ВОЛОДИМИРА ГНАТЮКА

Визначали утворення карбонільних похідних білків (КПБ) та супероксиданіона (O_2^-), а також Cu,Zn- та Mn-супероксиддисмутази (СОД) активності у печінці й зябрах карася (*Carassius carassius*) з умовно-чистої (З) та забрудненої (Б) водойми у три сезони. У риб групи Б ефективність антиоксидантного захисту в зябрах була вищою, а в печінці – нижчою, ніж у групі З. Активність Mn-СОД здебільшого узгоджується із вмістом O_2^- , а активність Cu,Zn-СОД у печінці негативно корелює з утворенням КПБ. Вплив несприятливих чинників викликає активацію антиоксидантного захисту в зябрах та його пригнічення у печінці риби.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: карась, супероксиддисмутаза, карбонільні похідні білків.

ВСТУП. Карась є унікальним організмом, в зябрах якого морфологічні пристосування забезпечують підвищення ефективності оксигенації за умов гіпоксії [2]. Проте біохімічні прояви цих пристосувань не відомі. Тому стало інте́рес порівняти толерантність тканини зябер і печінки карася до дії несприятливих чинників природного середовища. В попередніх дослідженнях на гідробонтах нами була ідентифікована відповідна місцевість у басейні р. Дністер [1]. Для характеристики стану системи антиоксидантного захисту ми обрали супероксиддисмутазу (СОД) активність, яка відображає первинну лінію захисту клітини від оксидативного ураження, причому диференційовано характеризує її в мітохондріях (Mn-СОД) та цитоплазмі (Cu,Zn-СОД), а також карбонільні похідні білків (КПБ) та супероксиданіон-радикал.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проводили у травні, липні й вересні 2008 р. на дорослих особинах карася, родина Коропових (*Carassius carassius*, *Cyprinidae*). Екземпляри тварин довжиною 15-20 см та середньою масою тіла 150-180 г відбирали з двох місцевостей: рибогосподарських ставків в урочищі Залізці у верхів'ї ріки Серет (умовно-чиста місцевість, група З) і ставу в нижній течії ріки Нічлава, нижче м. Борцова (забруднена, група Б), в районі високої аграрної активності. Екземпляри доставляли в лабораторію у воді з водойми, де досліджували не пізніше ніж через 12 год після відбору. Експерименти на

© Г.І. Фальфушинська, 2009.

рибах проводили відповідно до Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та наукових цілей (Страсбург, 1986), ухвали Першого національного конгресу з біоетики (Київ, 2000). В експерименті було використано 48 тварин.

Активність ізоформ СОД та утворення O_2^- визначали у розчинній фазі гомогенату, яку одержували в результаті його центрифугування протягом 10 хв при 6000×g. КПБ визначали як динітрофенілгідразинові похідні білків тканини. Детальний опис використаних методів дослідження подано у роботі [1]. Порівняльний аналіз біологічних параметрів здійснювали з використанням коефіцієнта Пірсона r , двоваріантного дисперсійного аналізу та t -критерію Стьюдента, застосовуючи комп'ютерні програми Statistica v 7.0 та Excel для Windows-2000.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Аналіз одержаних даних (табл. 1) демонструє сезонну динаміку з найвищим рівнем у літній період для більшості показників, що відповідає даним інших авторів [3] та, очевидно, пов'язано з активацією метаболізму за умов підвищених температур і аноксії, яка розвивається у тварин в період "цвітіння води" [2]. В кожний період дослідження спостерігаються відмінності між двома групами, причому часто вони протилежні у двох тканинах і свідчать про пригнічення антиоксидантного захисту в печінці у весняний і літній періоди та його активацію в зябрах протягом трьох сезонів і в печінці (за винятком показника Mn-СОД) восени у карася із забрудненої водойми.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Таблиця 1 – Біохімічні показники стану тканин карася з природних водойм ($M \pm \delta$, $n=8$)

Показник	Група тварин	Весна	Літо	Осінь
		Печінка		
Активність Cu,Zn-SOD, ум.од./мг білків	З	0,43±0,08	0,74±0,19	0,34±0,08
	Б	0,19±0,05 ^b	0,45±0,10 ^{a,b}	1,20±0,32 ^b
Активність Mn-SOD, ум.од./мг білків	З	0,74±0,26	1,22±0,30	0,64±0,15 ^a
	Б	0,90±0,09	0,86±0,15 ^b	0,05±0,01 ^{a,b}
Утворення супероксиданіона, нмоль/хв-мг білків	З	0,19±0,04	1,35±0,36 ^a	0,61±0,20 ^a
	Б	0,28±0,05 ^b	0,57±0,12 ^{a,b}	0,34±0,05 ^b
Вміст карбонільних похідних білків, нмоль/мг білків	З	16,6±2,8	13,2±2,1	5,0±0,9 ^a
	Б	14,5±3,6	25,7±10,1 ^{a,b}	2,4±0,5 ^{a,b}
Зябра				
Активність Cu,Zn-SOD, ум.од./мг білків	З	0,44±0,14	1,01±0,20 ^a	0,17±0,04 ^a
	Б	0,66±0,21	2,40±0,61 ^{a,b}	1,32±0,35 ^{a,b}
Активність Mn-SOD, ум.од./мг білків	З	0,78±0,22	2,52±0,51 ^a	0,09±0,03 ^a
	Б	0,74±0,20	1,63±0,51 ^a	0,35±0,02 ^{a,b}
Утворення супероксиданіона, нмоль/хв-мг білків	З	0,26±0,04	1,14±0,28 ^a	0,70±0,12 ^a
	Б	0,31±0,03	0,71±0,15 ^{a,b}	0,61±0,07 ^a
Вміст карбонільних похідних білків, нмоль/мг білків	З	7,6±2,1	23,4±3,8 ^a	15,5±2,0 ^a
	Б	9,6±2,1	20,1±3,9 ^a	7,2±1,3 ^b

Примітка. ^a – відмінності між сезонами, порівняно з весною, вірогідні; ^b – міжгрупові відмінності вірогідні, $p < 0,05$.

Що стосується клітини печінки, то встановлено негативну кореляцію для КПБ із Cu,Zn-SOD ($p < 0,05$) та позитивну з Mn-SOD ($p < 0,001$). Це узгоджується з даними, отриманими на клітинах дріжджів, нокаутних за генами Cu,Zn- та Mn-SOD [3]. Порівняння показників Mn-SOD та інтенсивності утворення O_2^- свідчить про те, що в мітохондріях як основному місці утворення O_2^- в клітині видалення даної активної форми кисню відбувається, головним чином, збалансовано з її утворенням. Зіставлення сезонної динаміки та просторових відмінностей вказує на те, що в осінній період адаптивні пристосування у зябрах карася до несприятливих умов існування є максимально ефективними, що супроводжується активацією антиоксидантної систе-

ми у печінці, тоді як у тварин із чистої водойми спостерігається її сезонне пригнічення.

ВИСНОВОК. Виявлено високу ефективність системи антиоксидантного захисту в зябрах карася *Carassius carassius* за впливу несприятливих чинників природного середовища. Cu,Zn-SOD може бути чинником захисту білків від окисної деструкції, а Mn-SOD – індикатором ефективності клітинного дихання в метаболічно активних тканинах карася.

Робота виконувалась за підтримки МОН України в межах Спільного Українсько-Корейського науково-технічного проекту № М/256-2008 та Західноукраїнського біомедичного товариства.

ЛІТЕРАТУРА

1. Falfushynska H.I., Stolyar O.B. Responses of biochemical markers in carp *Cyprinus carpio* from two field sites in Western Ukraine // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* – 72, № 7. – P. 729-736.
2. Lushchak V.I., Lushchak L.P., Mota A.A., Hermes-Lima M. Oxidative stress and antioxidant defences in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2001. – 280, № 1. – P. 100-107.

3. O'Brien K.M., Dirmeier R., Engle M., Poyton R.O. Mitochondrial Protein Oxidation in Yeast Mutants Lacking Manganese-(MnSOD) or Copper- and Zinc-containing Superoxide Dismutase (CuZnSOD): evidence that MnSOD and CuZnSOD have both unique and overlapping functions in protecting mitochondrial proteins from oxidative damage // *J. Biol. Chem.* – 2004. – 279, № 50. – P. 51817-51827.

ТКАНЕВАЯ СПЕЦИФИКА АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ ТОЛЕРАНТНОГО К ГИПОКСИИ ОРГАНИЗМА

Г.И. Фальфушинская

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ВЛАДИМИРА ГНАТЮКА

Резюме

Определяли образование карбонильных производных белков (КПБ) и супероксиданиона (O_2^-), а также Cu,Zn- и Mn-супероксиддисмутазные (СОД) активности в печени и жабрах карася (*Carassius carassius*) из условно-чистого (З) и загрязненного (Б) водоемов в три сезона. У рыб группы Б эффективность антиоксидантной защиты в жабрах была выше, а в печени – ниже, чем в группе З. Активность Mn-СОД в основном согласуется с содержанием O_2^- , а активность Cu,Zn-СОД в печени негативно коррелирует с образованием КПБ. Влияние неблагоприятных факторов вызывает активацию антиоксидантной защиты в жабрах и ее угнетение в печени рыбы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: карась, супероксиддисмутаза, карбонильные производные белков.

TISSUE SPECIFICITY OF ANTIOXIDANT DEFENCE IN TOLERANT TO HYPOXIA ORGANISM

H.I. Falfushynska

TERNOPIL NATIONAL PEDAGOGICAL UNIVERSITY BY VOLODYMYR HNATYUK

Summary

The formation of the protein carbonyls (PC) and superoxide anion (O_2^-) as well as the activities of Cu,Zn- and Mn-superoxide dismutase (SOD) in the liver and gills of *Carassius carassius* from relatively clean (Z) and polluted (B) areas in three seasons were determined. In the fish from group B, the effectivity of the antioxidant defence in the gills was higher and in the liver it was lower than in the group Z. The activity of Mn-SOD mostly correlates with the content of O_2^- and the activity of Cu,Zn-SOD in the liver correlates negatively with the formation of PC. The unfavourable factors provoke the activation of the antioxidative defence in the gills and its oppression in the liver of fish.

KEY WORDS: carassius, superoxide dismutase, protein carbonyls.

Отримано 7.09.2009 р.

Адреса для листування: Г.І. Фальфушинська, Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка, вул. М. Кривоноса, 2, Тернопіль, 46027, Україна.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

СТАН МІНЕРАЛЬНОГО МАТРИКСУ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ТВАРИН ЗА УМОВ ПОЄДНАНОЇ ДІЇ КСЕНОБІОТИКІВ

Н.С. Хопта, Г.М. Ерстенюк

ІВАНО-ФРАНКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Досліджували вплив поєднаної дії хлориду кадмію та нітриту натрію на рівень у плазмі крові білих безпородних щурів загального, іонізованого та зв'язаного кальцію, магнію, фосфатів та активність лужної фосфатази, а також вміст у стегновій кістці кальцію, магнію, кадмію та остеотропних мікроелементів – цинку і купруму на 1, 14 та 28-му доби після завершення введення ксенобіотиків.

Результати дослідження показали, що за умов поєднаної дії досліджуваних ксенобіотиків відбуваються суттєві зміни вмісту макро- та мікроелементів у складі кісткової тканини, що впливає на регуляцію метаболічних процесів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: хлорид кадмію, нітрит натрію, комбінована дія, кісткова тканина, ксенобіотики, мікроелементи.

ВСТУП. Метаболічні процеси в кістковій тканині, ступінь її мінералізації великою мірою визначаються вмістом життєво необхідних макро- та мікроелементів. Порушення їх рівня описано при аліментарному дефіциті кальцію [1], термічному ураженні та впливі солей важких металів (Zn, Cr, Pb) [11], за умов стресу і при різних патологіях ендокринної та кісткової систем [7, 12, 13, 17].

В сучасних умовах, коли зростає техногенне і антропогенне забруднення довкілля, важливого значення набуває вивчення комбінованої дії найпоширеніших ксенобіотиків, до яких належать солі важких металів, зокрема кадмію, нітрати та нітрити [8, 9]. Кадмій за останні десятиліття знайшов широке використання в промисловості: найбільші викиди в атмосферу в Європі пов'язані з виробництвом сталі (34 т за рік) та спалюванням різноманітних відходів (31 т за рік). В глобальному забрудненні довкілля сполуками кадмію антропогенний внесок втричі перевищує природні джерела [12]. Аналіз дієт країн Європи, за даними ряду авторів [7, 12, 13], показав, що в організм дорослої людини з їжею щоденно потрапляє від 4 до 84 мкг кадмію, хоча оптимальна інтенсивність його надходження не повинна перевищувати 1-5 мкг, при пороговому значенні токсичності – 30 мкг/добу [12]. Джерелом надходження сполук кадмію в

організм є також тютюновий дим, який містить їх значні концентрації, а 50 % металу, що потрапив в організм з цигарковим димом, абсорбується в легенях. Механізм пошкоджуючого впливу кадмію зумовлений його здатністю активувати процеси пероксидації ліпідів та білків при одночасному пригніченні антиоксидантного захисту, порушувати цілісність мембран, інгібувати активність ферментів, що мають важливе значення для підтримання гомеостазу організму [3, 4, 7, 9, 10]. Відома хвороба "ітаї-ітаї" – отруєння людей, викликане споживанням рису, що містить сполуки кадмію. При цьому розвиваються апатія, ушкодження нирок та кісток.

Поряд з важкими металами нітрати та нітрити є найбільш розповсюдженими забруднювачами довкілля в багатьох країнах світу, в тому числі в Україні. За даними лабораторій українських СЕС, у деяких сільських місцевостях рівень нітратів у криничній воді перевищує 480 мг/л, а в окремих випадках – 2200 мг/л, при максимально допустимій концентрації в Україні 45 мг/л. Відомо, що токсичність нітратів пов'язана з їх відновленою формою – нітритами, які, згідно з літературними даними [6, 10], сприяють окисненню гемоглобіну до метгемоглобіну, зумовлюють розвиток гемічної гіпоксії та знижують інтенсивність енергетичного обміну. Однак немає достатньої інформації щодо впливу нітритів на стан кісткової тканини.

© Н.С. Хопта, Г.М. Ерстенюк, 2009.

Стосовно поєднаної дії сполук кадмію та нітритів, то в наукових джерелах [1, 6] показано їх вплив на показники білкового обміну і стан захисних систем організму. Однак нез'ясованими залишаються біохімічні механізми впливу цих токсикантів на обмінні процеси в кістковій тканині.

Метою даної роботи було експериментально дослідити біохімічні механізми впливу комбінованої дії ксенобіотиків – хлориду кадмію і нітриту натрію – на показники метаболічних процесів у кістковій тканині тварин.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Експерименти проводили на білих безпородних щурах-самцях ($n=36$) масою 190-250 г, яких утримували в умовах віварію на стандартному раціоні. Тварин було поділено на дві групи: 1-ша група – інтактні ($n=12$), які отримували фізіологічний розчин (0,9 % розчин NaCl) відповідного об'єму; 2-га – тварини, які одержували водний розчин нітриту натрію (NaNO_2) з питною водою в дозі $1/10 \text{LD}_{50}$ (21 мг/кг маси тіла тварин), а також їм внутрішньом'язово вводили розчин CdCl_2 в дозі $1/10 \text{LD}_{50}$ (1,2 мг/кг маси тіла тварин). Інтоксикацію щурів здійснювали протягом 10 діб. З метою охоплення різних періодів адаптації тварин до дії ксенобіотиків забір матеріалу (кров, стегові кістки) проводили після декапітації під легким ефірним наркозом на 1-шу, 14-ту та 28-му доби після завершення введення токсикантів. Експеримент виконували з дотриманням вимог біоетики, відповідно до положень Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин [15].

Для оцінки впливу ксенобіотиків на стан мінерального обміну в кістковій тканині визначали такі показники: у плазмі крові – концентрацію загального та іонізованого кальцію, магнію, рівень фосфатів, активність лужної фосфатази (ЛФ) за допомогою уніфікованих методик з використанням наборів реактивів "Simko LTD", "Lachema" та "Філісіт-Діагностика"; у стегових кістках тварин – вміст макро- та мікроелементів Ca, Mg, Zn, Cu, а також Cd на атомно-абсорбційному спектрофотометрі С-115ПК. Зразки проб для озолення готували методом сухого озолення [9]. Отримані результати піддавали статистичній обробці з використанням критерію Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Проведені нами дослідження показали (табл. 1), що за умов поєднаної дії хлориду кадмію і нітриту натрію в організмі експериментальних тварин спостерігались суттєві зміни показників

кальцій-фосфорного обміну. Зокрема, активність ЛФ достовірно знижувалась ($p<0,001$) протягом всього періоду спостереження, а найнижчий рівень відзначено на 28-му добу – на 40 % порівняно з рівнем інтактних тварин. За таких обставин важливо дослідити рівень іонів металів, які є активаторами ферментів. З наукових джерел [1, 15] відомо, що для ЛФ такими активаторами є Zn^{2+} і Mg^{2+} , оскільки в активному центрі двох ідентичних субодиниць ЛФ знаходиться по два іони цинку й одного іону магнію. Результати дослідження концентрації Mg^{2+} у плазмі крові уражених тварин засвідчили її достовірне ($p<0,001$) зниження, відповідно, від 40 на 1-шу добу до 54-57 % на 14-ту і 28-му доби порівняно з інтактними. Це можна пояснити накопиченням Cd^{2+} , який є відомим антагоністом есенціальних двовалентних металів, зокрема кальцію, магнію, цинку та ін. [5, 6, 8, 10, 12].

Зниження активності ЛФ супроводжувалось неоднозначними змінами концентрації неорганічного фосфату. Найбільший рівень спостерігався на 1-шу добу після десятиденного ураження: на 62 % перевищував значення інтактних тварин. В наступний період (14-та доба) він наближався до контрольних значень, а на 28-му добу – на 25 % перевищував контрольні показники. Рівень фосфат-іонів великою мірою визначається активністю ЛФ, яка каталізує гідроліз фосфорно-ефірних зв'язків з утворенням PO_4^{3-} , що має важливе значення для процесів мінералізації кісткової тканини. Зменшення фосфату плазми на 14-й день після ураження щурів ксенобіотиками, очевидно, зумовлене зниженням активності ЛФ в цей час. З іншого боку, неорганічний фосфор перебуває під контролем паратгормону, кальцитоніну і вітаміну D. Порушення секреції або активності цих регуляторів може призвести до зміни кальцій-фосфорного обміну в організмі експериментальних тварин.

Стосовно концентрації кальцію в плазмі крові інтоксикованих щурів, то нами встановлено, що його вміст зростав протягом перших 14 днів після завершення інтоксикації до 21 % порівняно з контрольною групою. У віддалений період експерименту (28-ма доба) спостерігалось зниження загального вмісту кальцію на 27 % порівняно з 14-ю добою після завершення інтоксикації та на 12 % порівняно з інтактними тваринами. Відомо, що загальний вміст кальцію в сироватці крові як людини, так і тварин є важливою константою гомеостазу і становить в нормі 2,12-2,6 ммоль/л [2].

Для детальнішої характеристики метаболізму кальцію в організмі важливим є дослід

Таблиця 1 – Біохімічні показники плазми крові білих безпородних щурів-самців, яких піддавали нітритно-кадмієвій інтоксикації (n=36, M±m)

Досліджуваний показник	Група тварин			
	інтактні (n=12)	уражені хлоридом кадмію та нітритом натрію		
		1-ша доба (n=8)	14-та доба (n=8)	28-ма доба (n=8)
Активність ЛФ, мкмоль/с·л	15,073±0,085	10,842±2,277 p<0,025	9,300±1,230 p<0,001	9,118±1,954 p<0,001
Кальцій, ммоль/л	2,338±0,079	2,681±0,128 p<0,025	2,833±0,140 p<0,025	2,077±0,174 p<0,050
Ca ²⁺ , ммоль/л	0,356±0,01	0,430±0,036 p<0,005	0,384±0,019 p<0,025	0,348±0,024 p<0,01
Ca _{зв'язаний} , ммоль/л	1,983±0,079	2,251±0,139 p<0,005	2,31±0,298 p<0,01	1,809±0,298 p<0,01
Фосфати, мкг/мл	41,168±1,575	66,872±7,552 p<0,005	44,141±2,402 p<0,01	54,616±4,773 p<0,025
Магній, ммоль/л	0,719±0,083	0,433±0,019 p<0,01	0,309±0,028 p<0,001	0,331±0,033 p<0,005

Примітка. p – ступінь достовірності порівняно з інтактними тваринами.

Таблиця 2 – Показники вмісту основних макро- та мікроелементів у стегнових кістках білих безпородних щурів-самців, яких піддавали нітритно-кадмієвій інтоксикації (n=36, M±m)

Досліджуваний показник	Група тварин			
	інтактні n=12	уражені хлоридом кадмію та нітритом натрію		
		1-ша доба (n=8)	14-та доба (n=8)	28-ма доба (n=8)
Кальцій, мг/г золи	330,85±6,21	311,08±4,32**	305,65±3,28*	285,06±3,47*
Магній, мг/г золи	38,14±1,40	51,80±2,11*	34,62±1,81**	45,61±2,53*
Цинк, мкг/г золи	458,61±37,24	314,17±25,12*	252,90±32,81*	369,62±29,33**
Купрум, мкг/г золи	17,95±0,88	13,56±0,72*	13,12±1,21*	17,7±1,05
Кадмій, мкг/г золи	2,10±0,26	8,18±0,43*	8,85±0,52*	37,08±1,02*

Примітка. *(p<0,001) – ступінь достовірності порівняно з інтактними тваринами;
**(p<0,01) – ступінь достовірності порівняно з інтактними тваринами.

ження рівня іонізованого кальцію. Відомо, що саме іонізований кальцій плазми визначає біологічну активність цього елемента: іони кальцію беруть участь у регуляції проникності мембран, передачі гормональних сигналів, нервового імпульсу, функціонуванні міокарда, механізмах м'язового скорочення, згортанні крові тощо. Концентрація Ca²⁺ у плазмі крові уражених тварин на 1-шу та 14-ту доби після завершення введення ксенобіотиків була вищою, ніж в інтактних: на 1-шу добу – на 17 %, а в наступні періоди дещо зменшувалась і на 28-му добу була нижчою за контрольні показники (на 10-12 %). Такі зміни рівня Ca²⁺ у плазмі крові можуть свідчити про порушення функції прищитоподібної залози, оскільки відомо, що регуляція концентрації іонів Ca²⁺ здійснюється паратгормоном та кальцитоніном. На морфологічні порушення щитоподібної залози за умов кадмієвої інтоксикації вказує у своєму дослідженні D.J. Dodwell [16].

Стосовно впливу нітратів та нітритів на обмін кальцію, то в доступній літературі такі дані відсутні. Можна висловити припущення, що іони NO₃⁻ та NO₂⁻ можуть, як і карбонати [15], взаємодіяти з аморфним фосфатом кальцію і спричинити порушення цілісності мінерального матриксу кісткової тканини.

Встановлені зміни показників кальцій-фосфорного обміну в плазмі крові спонукали до вивчення кількісного вмісту основних мінеральних компонентів кісткової тканини піддослідних тварин. Проведені дослідження (табл. 2) дозволили встановити основні відмінності у хімічному складі мінерального матриксу, які полягають у тому, що протягом 28-денного спостереження рівень основного макроелемента кісткової тканини кальцію знижувався порівняно з контрольною групою: від 6,3 % на 1-шу добу, 7,6 % – на 14-ту до 13,8 % на 28-му добу після завершення введення досліджуваних ксенобіотиків.

Стосовно рівня магнію, то нами відзначено зростання його вмісту в стегновій кістці уражених тварин на 35,8 % (1-ша доба), потім він дещо знизився і на 28-му добу на 19,6 % залишався вищим рівня інтактних.

Зазнав суттєвих змін рівень остеотропних мікроелементів купруму і цинку. Вміст Cu на 1-шу і 14-ту доби становив тільки 73 % від рівня інтактних, а на 28-му добу підвищувався до норми. Вміст цинку в стегнових кістках тварин, яких піддавали інтоксикації, протягом всього періоду спостереження був суттєво меншим за показники інтактних щурів, найнижчий рівень спостерігався на 14-ту добу – на 45 % нижче рівня інтактних тварин.

Дослідження вмісту токсичного елемента Cd показало накопичення його в кістковій тканині, починаючи з 1-ї доби спостереження, – у 3,9 раза порівняно з інтактними. На завершення експерименту цей показник зростав у 17,7 раза порівняно з інтактними та у 4,2 раза порівняно з 14-ю добою спостереження.

Порушення макро- та мікроелементного складу кісткової тканини, яке спостерігалось за умов комбінованого впливу CdCl₂ та NaNO₂,

викликало структурні зміни мінерального матриксу кістки. Крім цього, купрум і цинк відігравали роль кофакторів, які мають важливе значення в регуляції метаболічних процесів у кістках, зокрема в утворенні колагенової матриці (Cu²⁺ як активатор проліл- та лізилгідроксилаз), обміні фосфатів (Zn²⁺ як активатор ЛФ). Отримані результати створюють підґрунтя для подальшого детальнішого вивчення метаболічних процесів у кістковій тканині за умов впливу досліджуваних ксенобіотиків та пошуку засобів фармакологічної корекції виявлених порушень.

ВИСНОВКИ. 1. Поєднана дія хлориду кадмію та нітриту натрію на організм експериментальних тварин зумовлює накопичення у кістковій тканині кадмію, що спричиняє порушення вмісту макро- (Ca та Mg) і мікроелементів (Zn, Cu).

2. Порушення мінерального складу кістки уражених тварин супроводжується різнонаправленими змінами показників кальцій-фосфорного обміну, зокрема кальцію, магнію, фосфатів та активності лужної фосфатази.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бенгус Л.М. Ультраструктурная характеристика костного ремоделирования в условиях алиментарного дефицита кальция // Укр. морфол. альманах. – 2003. – **1**, № 2. – С. 9-13.

2. Бойків Д.П. Біохімічні показники в нормі і при патології: Навчальний довідник / За ред. О.Я. Склярова. – К.: Медицина, 2007 – 320 с.

3. Головка Л.Л. Стан захисних систем організму за умов поєднаної дії солей кадмію і свинцю та нітриту натрію // Мед. хімія. – 2004. – **6**, № 3. – С. 176.

4. Ерстенюк Г.М. Динаміка змін оксигемоглобіну в щурів при введенні хлориду кадмію // Мед. хімія. – 2003. – **5**, № 4. – С. 23-25.

5. Ерстенюк Г.М. Стан лігандних форм гемоглобіну щурів за умов кадмієвої інтоксикації // Мед. хімія. – 2004. – **6**, № 3. – С. 101-103.

6. Задоріна О.В., Парамонова Г.І., Ягупова А.С. та ін. Оксигеназні реакції в мікосомальній фракції гепатоцитів щурів за умов нітратної інтоксикації та корекції вітамінами-антиоксидантами // Мед. хімія. – 2008. – **10**, № 2. – С. 17- 21.

7. Кудрин А.В., Громова О.А. Микроэлементы в иммунологии и онкологии. – М.: ГЭОТАР–Медиа, 2007. – 544 с.

8. Кундиев Ю.И., Трахтенберг И.М. Химическая опасность в Украине и меры по ее предупреждению // Журн. АМН України. – 2004. – **10**, № 2. – С. 259-267.

9. Нейко Е.М., Губський Ю.І., Ерстенюк Г.М. Інтоксикація кадмієм: токсикокінетика і механізм біоцид-

них ефектів (огляд літератури і власних досліджень) // Журн. АМН України. – 2003. – **9**, № 2. – С. 250-261.

10. Острівка О.І., Гонський Я.І. Вплив комбінованої дії хлориду кадмію та нітриту натрію на показники білкового обміну в крові та печінці щурів, опромінених низькими дозами радіації // Мед. хімія. – 2006. – **8**, № 2. – С. 49-52.

11. Романюк А.М., Моїсеєнко О.С., Романюк К.А. Особливості реакції кісток скелета при термічному ураженні та впливу солей важких металів // Укр. морфол. альманах. – 2006. – **4**, № 2. – С. 95- 97.

12. Скальный А.В. Химические элементы в физиологии и экологии человека. – М.: Издательский дом “ОНИКС 21 век” – Мир, 2004. – 216 с.

13. Трахтенберг И.М., Колесников В.С., Луковенко В.П. Тяжелые металлы во внешней среде // Соврем. гигиен. и токсикол. аспекты. – Мн.: Наука і техніка, 1994. – 285 с.

14. Хавезов І., Цалев Д. Атомно-абсорбційний аналіз. – Л.: Хімія, 1983. – С. 144.

15. Baron R. L'osteoclaste et les mecanismes moleculaires de la resorption ossreuse // Med. Sci. – 2001. – **17**, – № 12. –P. 1260-1269.

16. Dodwell D.J. Malignant bone resorption: cellular and biochemical mechanisms // Ann. Oncol. – 1992. – **3**. – P. 257-267.

17. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose: Council of Europe 18.03.1986. – Strasbourg, 1986. – 52 p.

СОСТОЯНИЕ МИНЕРАЛЬНОГО МАТРИКСА КОСТНОЙ ТКАНИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ В УСЛОВИЯХ СОВМЕЩНОГО ДЕЙСТВИЯ КСЕНОБИОТИКОВ

Н.С. Хопта, А.М. Эрстенюк
ИВАНО-ФРАНКОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

Резюме

Исследовали влияние комбинированного действия хлорида кадмия и нитрита натрия на уровень в плазме крови белых беспородных крыс общего, ионизированного и связанного кальция, магния, фосфатов и активность щелочной фосфатазы, а также содержание в бедренной кости кальция, магния, кадмия и остеотропных микроэлементов – цинка и меди на 1, 14 та 28-е сутки после окончания введения ксенобиотиков.

Результаты исследования показали, что в условиях комбинированного действия исследуемых ксенобиотиков происходят существенные изменения содержания макро- и микроэлементов в составе костной ткани, что влияет на регуляцию метаболических процессов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: хлорид кадмия, нитрит натрия, комбинированное действие, костная ткань, ксенобиотики, микроэлементы.

CONDITION OF MINERAL MATRIX OF BONE TISSUE OF EXPERIMENTAL ANIMALS UNDER CONDITIONS OF COMBINED ACTION OF XENOBIOTICS

N.S. Khopta, H.M. Erstenyuk
IVANO-FRANKIVSK NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY

Summary

It was investigated the influence of combined action of cadmium chloride and sodium nitrite on the level of total, ionized and bound calcium, magnesium, phosphates and activity of alkaline phosphatase in blood plasma of white outbred rats as well as content of calcium, magnesium, cadmium and bone-seeking microelements of copper and zinc in femoral bone on the 1, 14 and 28th day after completion of xenobiotics introduction.

The results of research showed that under conditions of combined action of the investigated xenobiotics the substantial modifications of macro- and microelements in the composition of bone tissue take place and they influence on the regulation of metabolic processes.

KEY WORDS: cadmium chloride, sodium nitrite, combined action, bone tissue, xenobiotics, microelements.

Отримано 17.09.2009 р.

Адреса для листування: Н.С. Хопта, вул. Коновальця, 128, кв. 88, Івано-Франківськ, 76014, Україна.

ЕФЕКТ ДОНАТОРІВ ОКСИДУ АЗОТУ L-АРГІНІНУ ТА (+-)-(E)-ЕТИЛ-2-[(E)ГІДРОКСИІМІНО]-5-НІТРО-3-ГЕКСЕНАМІДУ НА ГЕПАТОТОКСИЧНІСТЬ АЛІЛОВОГО СПИРТУ

М.М. Корда, Т.Я. Ярошенко, Я.В. Панасюк

ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО

Досліджували вплив донаторів оксиду азоту – субстрату для NO-синтази L-аргініну і FK409 на функціональний стан кальційзалежної NO-синтази та загальну активність NO-синтази печінки. При інтоксикації аліловим спиртом встановлено, що L-аргінін підвищував кальційстимульовану продукцію NO в печінці, тоді як FK409 суттєво не впливав на даний показник. Обидва препарати не викликали суттєвих змін загальної активності NO-синтази.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: аліловий спирт, оксид азоту, печінка.

ВСТУП. У зв'язку з широким спектром біологічної дії оксиду азоту (NO), використовують різні його донатори, які діють або системно, або специфічно на певні органи, включаючи печінку. В літературі є повідомлення, що більшості донаторам NO властивий коригувальний ефект при токсичному ураженні печінки [4, 11], однак деякі автори відмічають зворотний ефект [1]. Метою даної роботи було дослідити вплив різних донаторів NO на перебіг гепатиту, викликаного аліловим спиртом (АС).

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди проведені на нелінійних білих щурах-самцях масою 180-200 г, яких утримували в умовах віварію. Піддослідні тварини були поділені на 4 групи: 1-ша – інтактні; 2-га – уражені АС; 3-тя – щури, уражені АС, яким вводили донатор оксиду азоту L-аргінін; 4-та – щури, уражені АС, яким вводили донатор оксиду азоту (+-)-(E)-етил-2-[(E)гідроксиіміно]-5-нітро-3-гексенамід (FK409). АС вводили тваринам 2-4 груп одноразово внутрішньоочеревинно у дозі 30 мг·кг⁻¹ маси щура [2]. Інтактним тваринам вводили ізотонічний розчин натрію хлориду. L-аргінін вводили щурам в дозі 0,2 г·кг⁻¹ протягом 14 днів (12 днів перед введенням АС, в день інтоксикації і наступного дня за кілька годин до декапітації) [3]. FK409 вводили тваринам одноразово орально в дозі 10 мг·кг⁻¹ маси тіла за 30 хв до інтоксикації [5].

© М.М. Корда, Т.Я. Ярошенко, 2009.

Тварин декапітували під тіопенталовим наркозом на 1-шу та 3-тю доби з моменту введення АС. Вміст NO в тканині печінки визначали електрохімічним методом [6]. Робочий електрод (наносенсор) для визначення кількості NO готували, як описано в роботі [10]. Рівень NO розраховували за допомогою калібрувальної кривої (до і після вимірювання наносенсор калібрували, використовуючи стандартні розчини оксиду азоту). Сумарну активність NO-синтази печінки визначали колориметрично [7].

Результати досліджень піддавали статистичній обробці, використовуючи критерій Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Аналізуючи одержані результати (табл. 1), можна стверджувати, що застосування субстрату для ендотеліальної NO-синтази – L-аргініну значно підвищувало показники активності ферменту. Максимальна продукція NO тканиною печінки уражених тварин, яка на 1-шу добу експерименту була майже вдвічі нижчою, ніж в інтактних щурів, після введення L-аргініну достовірно (на 30 %) збільшилась. Нами зафіксовано підвищення активності кальційзалежної NO-синтази після дворазового введення L-аргініну ураженим АС тваринам.

Відповідно, підвищувалися під впливом L-аргініну показники швидкості утворення і вивільнення NO. Якщо на 1-шу добу експерименту мала місце тільки тенденція до зростання

даних показників, то на 3-тю добу після стимуляції тканини печінки тварин, яким вводили L-аргінін, нами зафіксовано достовірне збільшення швидкості утворення NO (на 45 %) порівняно з нелікованими щурами.

У літературі є повідомлення, що новий спонтанний донатор NO – FK409 ефективно захищає печінку від пошкодження, індукованого ішемією/реперфузією у щурів і собак [1, 8]. На відміну від L-аргініну, введення отруєним АС тваринам спонтанного донатора NO – FK409 не викликало змін активності ендотеліальної NO-синтази, які були б статистично достовірними, хоча при дворазовому введенні препарату спостерігали чітку тенденцію до підвищення показників як швидкості утворення NO, так і максимальної його кількості.

Характеризуючи дані, що відображають зміни загальної активності NO-синтази в ураженій АС печінці при застосуванні донаторів NO, можна побачити: ні одноразове, ні дворазове використання L-аргініну чи FK409 достовірного впливу на загальну активність NO-

синтази не справило. Це дещо парадоксальний результат, оскільки є очевидним, що при введенні субстрату для функціонування NO-синтази кількість продукту ферменту повинна збільшитися. Проте не слід забувати, що ми визначали активність NO-синтази *in vitro* в системі, що містила високу концентрацію амінокислоти. Очевидно, інкубація ферменту з L-аргініном нівелювала різницю у функціональному стані NO-синтази в нелікованих і лікованих щурів.

Подібно до L-аргініну, ні на 1-шу, ні на 3-тю доби після введення донатора оксиду азоту – FK409 не спостерігалось суттєвої активації чи пригнічення загальної NO-синтазної активності. Такий результат був очікуваним, оскільки даний препарат є спонтанним звільнювачем NO і безпосередньо на NO-синтазу не впливає, а зростання концентрації NO в тканині печінки, якщо і мало місце, то, очевидно, було не настільки значним, щоб за принципом зворотного зв'язку інгібувати активність ферменту.

Таблиця 1 – Показники стимульованої іонофором кальцію швидкості утворення (dc/dt), вивільнення ($-dc/dt$) і максимальної концентрації (C_{max}) NO, активності NO-синтази в печінці щурів при дії L-аргініну і FK409 на гепатотоксичність АС ($M \pm m$; $n=10$)

Група тварин	Показник			
	dc/dt , нмоль/л·с	$-dc/dt$, нмоль/л·с	C_{max} , нмоль/л·хв	NO-синтаза, нм
Інтактні	150,15±8,55	24,30±2,08	160,00±12,20	0,75±0,08
1-ша доба після інтоксикації				
АС	43,10±3,20*	13,40±1,04*	85,50±8,88*	1,35±0,20*
АС + L-аргінін	57,20±3,10**	16,10±0,89	112,00±7,01*	1,47±0,12
АС + FK409	42,05±4,01	11,08±0,70	88,20±8,62	1,33±0,09
3-тя доба після інтоксикації				
АС	55,30±6,31*	16,85±2,80	99,06±6,20*	1,04±0,15
АС + L-аргінін	80,36±6,02**	19,10±1,15	130,12±8,02**	1,10±0,08
АС + FK409	61,20±5,20	22,80±1,50	115,25±9,42	1,15±0,09

Примітка. dc – зміна концентрації; dt – зміна часу; * – зміни достовірні ($p < 0,05$) відносно відповідних показників у групі інтактних тварин; ** – зміни достовірні ($p < 0,05$) відносно відповідних показників у групі контрольних тварин, що отримували аліловий спирт.

ВИСНОВОК. Застосування як субстрату для NO-синтази – L-аргініну, так і спонтанного донатора NO – FK409 призводило до змін функціонального стану кальційзалежної ендотеліальної NO-синтази та індукцибельної NO-синта-

зи в печінці. При цьому L-аргінін підвищував кальційстимульовану продукцію NO в печінці, тоді як FK409 суттєво не впливав на даний показник. Обидва препарати не викликали суттєвих змін загальної активності NO-синтази.

ЛИТЕРАТУРА

1. Aiba M., Takeyoshi I., Ohwada S. et al. Novel nitric oxide donor (FK409) ameliorates liver damage during extended liver resection with warm ischemia in dogs // *J. Am. Coll. Surg.* – 2001. – № 193. – P. 264-271.
2. Alam K., Nagi M.N., Al-Shabanah O.A. et al. Beneficial effect of nitric oxide synthase inhibitor on hepatotoxicity induced by allyl alcohol // *J. Biochem. Mol. Toxicol.* – 2001. – **15**, № 6. – P. 317-321
3. Anaya-Prado R., Toledo-Pereyra L.H., Guo R.F. et al. The attenuation of hemorrhage-induced liver injury by exogenous nitric oxide, L-arginine, and inhibition of inducible nitric oxide synthase // *Invest. Surg.* – 2003. – № 16 (5). – P. 247-261.
4. Farghali H., Canova N., Gaier N. et al. Inhibition of endotoxemia-induced nitric oxide synthase expression by cyclosporin A enhances hepatocyte injury in rats: amelioration by NO donors // *Int. Immunopharmacol.* – 2002. – № 2. – P. 117-127.
5. Kita Y., Hirasawa Y., Maeda K. et al. Spontaneous nitric oxide release for the potent pharmacological actions of FK409 // *Pharmacol.* – 1994. – **257**, № 1-2. – P. 123-130.
6. Malinski T., Mesaros S., Patton S.R., Mesarosova A. Direct measurement of nitric oxide in the cardiovascular system // *Physiol. Res.* 1996. – № 45. – P. 279-284.
7. Sass G., Koerber K. Inhibition of endotoxemia-induced nitric oxide synthase expression by cyclosporin A enhances hepatocyte injury in rats: amelioration by NO donors // *Int. Immunopharmacol.* – 2002. – № 2. – P. 117-127.
8. Shimamura T., Zhu Y., Zhang S. et al. Protective role of nitric oxide in ischemia and reperfusion injury of the liver // *J. Am. Coll. Surg.* – 1999. – № 188. – P. 43-52.
9. So H.S., Jung B.H., Song H.S. et al. Nitric oxide prevents the IFN-gamma/LPS-induced hepatotoxicity in a protein kinase G-independent manner // *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* – 2001. – № 23. – P. 321-334.
10. Stuehr D., Kwon N.S., Nathan C., Griffiths O. Nw-Hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine // *J. Biol. Chem.* – 1991. – № 266. – P. 6259-6263.
11. Stumm M.M., D'Orazio D., Sumanovski L.T. et al. Endothelial, but not the inducible, nitric oxide synthase is detectable in normal and portal hypertensive rats // *Liver.* – 2002. – **22**, № 6. – P. 441-450.

ЭФФЕКТ ДОНАТОРОВ ОКСИДА АЗОТА L-АРГИНИНА И (+-)-(E)-ЭТИЛ-2-[(E)ГИДРОКСИИМИНО]-5-НИТРО-3-ГЕКСЕНАМИДА НА ГЕПАТОТОКСИЧНОСТЬ АЛЛИЛОВОГО СПИРТА

М.М. Корда, Т.Я. Ярошенко, Я.В. Панасюк
ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ И.Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

Резюме

Исследовали влияние донаторов оксида азота – субстрата для NO-синтазы L-аргинина и FK409 на функциональное состояние кальцийзависимой NO-синтазы и общую активность NO-синтазы печени. При интоксикации аллиловым спиртом установлено, что L-аргинин повышал кальцийстимулирующую продукцию NO в печени, тогда как FK409 существенно не влиял на данный показатель. Оба препарата не вызывали существенных изменений общей активности NO-синтазы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: аллиловый спирт, оксид азота, печень.

THE EFFECT OF NO DONORS L-ARGININE AND FK409 ON THE ALLYL ALCOHOL HEPATOTOXICITY

M.M. Korda, T.Ya. Yaroshenko, Ya.V. Panasyuk
TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY BY I.YA. HORBACHEVSKY

Summary

The effect of NO donors L-arginine and FK409 on the functional state of Ca-dependent NO synthase and total activity of NO synthase in liver in allyl alcohol intoxication has been studied. It has been shown that L-arginine increased Ca-stimulated NO production in liver, whereas FK409 did not affect this index. Both preparations did not cause considerable changes of the NO-synthase total activity.

KEY WORDS: allyl alcohol, nitric oxide, liver.

Отримано 25.09.2009 р.

Адреса для листування: М.М. Корда, Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського, м. Воли, 1, Тернопіль, 46001, Україна.

АКТИВНІСТЬ ГЛУТАТІОНТРАНСФЕРАЗИ В РІЗНИХ ОРГАНАХ ЩУРІВ ЗА УМОВ ХРОНІЧНОЇ АЛКОГОЛЬНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ ПРИ ВПЛИВІ ОЦТОВОКИСЛОГО ЦИНКУ

О.І. Харченко, В.О. Чайка, Л.М. Гайда, Л.І. Богун, Л.І. Остапченко
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

Хронічна алкогольна інтоксикація призводить до зниження глутатіонтрансферазної активності в печінці та мозку з паралельним зростанням цього показника в сироватці крові щурів. За умов введення оцтовокислого цинку при алкогольній інтоксикації спостерігається поступова нормалізація активності глутатіонтрансферази в усіх досліджуваних органах.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: хронічна алкогольна інтоксикація, етанол, оцтовокислий цинк, глутатіонтрансфераза.

ВСТУП. Сьогодні одним із поширених факторів несприятливого впливу на організм є алкоголь. В основі розвитку цього захворювання лежать глибокі зміни метаболізму, що призводять до порушень біогенезу, структури і функції клітин різних органів та систем людини [7]. Відомо, що патогенез хронічної алкогольної інтоксикації супроводжується дефіцитом цинку в ряді органів, тому перспективним напрямком у лікуванні та профілактиці даної патології є використання солей цинку, серед яких низькою токсичністю характеризується оцтовокислий цинк [6].

Поряд з великою кількістю робіт, що стосуються визначення механізмів біологічної дії етанолу, окремі сторони його впливу на організм людини та тварин недостатньо вивчено, а встановлені факти є суперечливими. Особливу увагу привертають роботи, присвячені дослідженню функціонування детоксикаційної системи печінки як основного органа метаболізму етанолу та мозку як однієї з головних мішеней дії спирту. Ключовим ферментом цієї системи, що відіграє важливу роль в детоксикації, деградації та виведенні з організму чужорідних органічних сполук, є глутатіонтрансфераза.

Тому метою нашого дослідження було визначити вплив оцтовокислого цинку на активність глутатіонтрансферази гепатоцитів, клітин мозку та сироватки крові при хронічній алкогольній інтоксикації щурів.

© О.І. Харченко, В.О. Чайка, Л.М. Гайда, Л.І. Богун, Л.І. Остапченко, 2009.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проводили на щурах-самцях масою 180-200 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію з вільним доступом до води. 40° етиловий спирт та оцтовокислий цинк вводили за рекомендаціями [1]. Визначення активності глутатіонтрансферази (ГТ) проводили в гепатоцитах, гомогенаті мозку та сироватці крові на 4, 7, 11, 16, 21-шу доби експерименту [5]. Вміст білка визначали за методом Бредфорд. Результати статистично обробляли за t-критерієм Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Глутатіонтрансферази – універсальні ферменти, які шляхом трансформації, нековалентного зв'язування та ковалентного приєднання запобігають пошкодженню ДНК, мітохондрій та інших життєво важливих центрів клітини від шкідливих сполук і в результаті значно збільшують стійкість клітини й організму в цілому [8].

У результаті досліджень нами було встановлено зниження активності глутатіонтрансферази в гепатоцитах щурів за умов хронічної алкогольної інтоксикації, причому найбільш суттєве зниження – в 1,7 раза відносно контрольних значень – спостерігалось на 11-ту та 16-ту доби (табл. 1).

Тенденція до зниження активності досліджуваного ферменту мала місце і при введенні оцтовокислого цинку, причому найбільші зміни відбувались на 7-му та 11-ту доби дослідження. Порівняно з відповідними термінами дослідження при дії етанолу активність ГТ зроста-

ла на більш пізніх етапах дослідження (11-та, 16-та і 21-ша доби) в 1,3; 1,4 та 1,6 разів відповідно (табл. 1).

Встановлене нами зниження активності ГТ при хронічному введенні етанолу узгоджується з даними ряду дослідників. Показано зниження глутатіонтрансферазної активності з паралельним зменшенням вмісту відновленого глутатіону (ВГ) у печінці мишей та щурів за 45-денної моделі алкоголізації [4]. Всупереч вищезазначеному, інші автори вказують на зростання активності цього ферменту за 21-денної експериментальної моделі алкоголізації з паралельним зниженням вмісту ВГ та активностей супероксиддисмутази і каталази [9].

Зниження активності ГТ при хронічній алкогольній інтоксикації поступово нормалізувалось при введенні оцтовокислого цинку. Подібні ефекти були продемонстровані при введенні сульфату цинку, яке призводило до помірної нормалізації функціонування ензиму

за 4- та 8-тижневої моделі алкоголізації, пояснюючи зазначений ефект антиоксидантними властивостями металу, а також його здатністю індукувати синтез металотіонеїнів [10].

Наступним органом, фізіологія якого значно змінюється при хронічному екзогенному надходженні етанолу, є мозок. Пригнічення його захисних механізмів призводить до розвитку метаболічних порушень та сприяє розвитку патологічного потягу до алкоголю.

Нами встановлено зниження активності ГТ на 11-ту, 16-ту і 21-шу доби в 1,2; 1,5 та 1,7 разів відповідно порівняно з контролем (табл. 1). Введення оцтовокислого цинку за експериментальних умов у клітинах мозку також призводило до незначного зростання активності на 4-ту добу. На подальших етапах активність ГТ була дещо знижена. Порівняно з відповідними часовими періодами при хронічній алкогольній інтоксикації активність ГТ на 11-ту, 16-ту та 21-шу доби зростала.

Таблиця 1 – Активність глутатіонтрансферази гепатоцитів, клітин мозку та сироватки крові щурів за умов хронічної алкогольної інтоксикації при введенні оцтовокислого цинку (мкмоль/хв · мг)

	Гепатоцити		Клітини мозку		Сироватка крові	
	Е	Е+Zn	Е	Е+Zn	Е	Е+Zn
К	583,5±24,6		153,8±3,87		48,4±5,03	
4 доба	474±17,5*	489,6±21,1*	164,3±7,84*	159,5±7,5*	73,8±5,7*	58,7±3,1**
7 доба	448,7±14,1*	446,1±19,7*	130,6±3,22*	134,8±7,8*	77,8±4,1*	69,5±3,4**
11 доба	342,4±13,8*	447,6±15,4**	124,3±10,84*	139±8,4**	80,1±4,6*	60±2,9**
16 доба	358,1±13,7*	485,4±17,4**	102,7±11,72*	137,3±7,9**	94,7±4,8*	55±2,7**
21 доба	330,8±14,2*	514,1±20,5**	92,2±8,06*	141,7±8,6**	95±3,9*	37,9±1,8**

Примітка. * – $p \leq 0,05$ порівняно з контролем; # – $p \leq 0,05$ порівняно з етанолом.

Отримані нами дані узгоджуються з результатами інших дослідників. Зниження активності ГТ мозку було продемонстровано за умов 4-тижневої моделі алкоголізації щурів [12, 13]. Вважають, що однією з причин зниження активності ферменту може бути виснаження вмісту відновленого глутатіону [2]. Глутатіон трансфераза є чутливим індикатором нейротоксичності, тому встановлена нами поступова нормалізація активності цього ферменту у клітинах мозку при введенні оцтовокислого цинку за умов хронічної алкогольної інтоксикації є ще одним доказом протекторної дії досліджуваної сполуки [8].

Відомо, що дослідження біохімічних параметрів сироватки крові дозволяє судити про загальний статус організму і широко використовується у діагностичних тестах.

В сироватці крові активність ГТ зростала на всіх етапах дослідження дії етанолу, досягаючи максимуму на 21-шу добу, коли перевищувала контрольні показники в 2 рази (табл. 1). При введенні оцтовокислого цинку за умов хронічної алкогольної інтоксикації в сироватці крові глутатіонтрансферазна активність також зростала, особливо на 7-му добу. В подальшому активність ГТ поступово знижувалась до значень контрольних показників. Порівняно з відповідними часовими термінами за умов дії етанолу активність даного ензиму була нижчою на всіх етапах дослідження (табл.1). Досліджене нами зростання активності ензиму в сироватці крові при хронічній алкогольній інтоксикації може бути пов'язане з відомим фактом підвищення цього показника при ушкодженні печінки [8].

Таким чином, нами встановлено, що вплив етанолу на активність ГТ відзначався органо-специфічним характером: зниження активності ферменту в печінці та мозку відповідало зростанню цього показника у сироватці. Введення ж оцтовокислого цинку за умов хронічної інтоксикації призводило до поступової нормалізації зазначених змін в усіх досліджуваних органах.

Можливою причиною показаного нами впливу оцтовокислого цинку на активність глутатіонтрансферази може бути дія даних сполук на вміст ВГ. Показано, що введення цинку запобігало зменшенню рівня глутатіону в печінці при хронічній алкоголізації [11]. Окрім того, введення сполук цинку викликало індукцію синтезу металотіонеїнів, що є дуже подібним до глутатіону внаслідок того, що одна третина їх амінокислот – цистеїни. Експериментальне виснаження глутатіону в ізольованих гепатоцитах щурів, як було показано, спричиняло збільшення синтезу металотіонеїнів та утворення нових тіольних груп у клітинах [6, 9], що може сприяти поступовому відновленню пулу глутатіону.

ВИСНОВКИ. Хронічна алкогольна інтоксикація призводить до змін у функціонуванні

глутатіонтрансферази в різних органах щурів. У печінці спостерігається зниження її активності, що може бути наслідком зменшення рівня відновленого глутатіону і свідчити про поступове виснаження глутатіонової ланки захисту клітин. У подальшому це може призвести до порушення захисних та детоксифікаційних властивостей печінки і сприяти розвитку хронічних алкогольних патологій даного органа (алкогольна хвороба печінки, жирове переродження та цирози). У клітинах мозку спостерігаються такі ж тенденції до змін активності досліджуваного ферменту. Встановлене нами зростання активності ГТ у сироватці може свідчити про компенсаторно-адаптивні реакції, які розвиваються в організмі у відповідь на хронічне надходження екзогенного етанолу.

Поступова нормалізація активності глутатіонтрансферази в усіх досліджуваних органах при введенні оцтовокислого цинку за умов хронічної алкогольної інтоксикації є доказом зниження цієї сполукою ступеня оксидативного стресу, що може призвести до покращення функціонування клітин та запобігти подальшому розвитку патології.

ЛІТЕРАТУРА

1. Харченко Л.И., Чайка В.О., Гавриш Л.И. Влияние уксуснокислого цинка на содержание цитохрома р450 в печени крыс с хронической алкогольной интоксикацией // XII Российская гастроэнтерологическая неделя (Москва, 10-12 октября 2008 г.). – С. 118.
2. Balasubramanian V., Kalaivani Sailaja J., Nalini N. Role of leptin on alcohol-induced oxidative stress in Swiss mice // *Pharmacol. Res.* – 2003. – **47**, № 3. – P. 211-216.
3. Davenport C.J., Ali S.F., Miller F.J. et al. Effect of methyl bromide on regional brain glutathione, glutathione-S-transferases, monoamines, and amino acids in F344 rats // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 1992. – **112**, № 1. – P. 120-127.
4. Faremi T.Y., Suru S.M., Fafunso M.A., Obioha U.E. Hepatoprotective potentials of *Phyllanthusamarus* against ethanol-induced oxidative stress in rats // *Food Chem. Toxicol.* – 2008. – **46**, № 8. – P. 2658-2664.
5. Habig W.H., Parst M.J., Jakobv W.B. Glutathione-S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation // *J. Biol. Chem.* – 1974. – **249**, № 22. – P. 7130-7139.
6. Kang Y.J., Zhou Z. Zinc prevention and treatment of alcoholic liver disease // *Mol. Aspects Med.* – 2005. – **26**, № 4-5. – P. 391-404.
7. Kushnir E.A., Lovat M.L., Obukhova M.F.

Polyoxidonium in the immunological correction of alcoholic motivation // Immunology. – 2004. – № 2. – P. 87.

8. Loguercio C., De Girolamo V., Cuomo A. et al. Determination of plasma a-glutathione-S-transferases in chronic alcohol abusers: relationship with alcohol intake and liver involvement // *Alcohol and Alcoholism.* – 1998. – **33**, № 4. – P. 366-372.

9. Pathak A., Mahmood A., Pathak R., Dhawan D. Effect of zinc on hepatic drug metabolism under ethanol toxicity // *Drug Chem. Toxicol.* – 2008. – **31**, № 1. – P. 163-173.

10. Prasunpriya N., Subir Kumar Das, Vasudevan D.M. Role of ethanol on aluminum – induced biochemical changes on rat brain // *Indian Journal of Clinical Biochemistry.* – 2006. – **21**, № 2. – P. 53-57.

11. Sidhu P., Garg M.L., Dhawan D.K. Protective effects of zinc on oxidative stress enzymes in liver of protein deficient rats // *Nutr. Hosp.* – 2004. – **19**, № 6. – P. 341-347.

12. Subir K., Hiran K.R., Sukhes M., Vasudevan D.M. Oxidative stress is the primary event: Effects of ethanol consumption in brain // *Indian Journal of Clinical Biochemistry.* – 2007. – **22**, № 1. – P. 99-104.

13. Yu B.P. Cellular defence against damage from reactive oxygen species // *Physiol. Rev.* – 1994. – **74**. – P. 139-162.

АКТИВНОСТЬ ГЛУТАТИОНТРАНСФЕРАЗЫ В РАЗНЫХ ОРГАНАХ КРЫС В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ПРИ ВЛИЯНИИ УКСУСНОКИСЛОГО ЦИНКА

О.И. Харченко, В.О. Чайка, Л.М. Гайда, Л.И. Богун,
Л.И. Остапченко

КИЕВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ТАРАСА ШЕВЧЕНКО

Резюме

Хроническая алкогольная интоксикация приводит к снижению глутатионтрансферазной активности в печени и мозге с параллельным ростом этого показателя в сыворотке крови крыс. При введении уксуснокислого цинка в условиях алкогольной интоксикации наблюдается постепенная нормализация активности глутатионтрансферазы во всех исследуемых органах.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: хроническая алкогольная интоксикация, этанол, уксуснокислый цинк, глутатионтрансфераза.

GLUTATHIONE TRANSFERASE ACTIVITY IN DIFFERENT RAT ORGANS UNDER CHRONIC ALCOHOLIC INTOXICATION AND ACETIC ZINC INFLUENCE

O.I. Kharchenko, V.O. Chayka, L.M. Gayda, L.I. Bogun,
L.I. Ostapchenko

KYIV NATIONAL UNIVERSITY BY TARAS SHEVCHENKO

Summary

The chronic alcoholic intoxication leads to decrease of glutathione transferase activity in liver and brain with parallel growth of this indicator in blood serum of rats. Acetic zinc introduction under the alcoholic intoxication conditions causes gradual normalization of glutathione transferase activity in all investigated organs.

KEY WORDS: chronic alcoholic intoxication, ethanol, acetic zinc, glutathione transferase.

Отримано 21.09.2009 р.

Адреса для листування: О.І. Харченко, вул. Чорнобильська, 3, кв. 55, Київ, 03179, Україна.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

ГЛІКОЗИЛЬОВАНІСТЬ ПОВЕРХНЕВИХ ГЛІКОКОН'ЮГАТІВ ІМУНОКОМПЕТЕНТНИХ КЛІТИН ПРИ НОВОУТВОРЕННЯХ ГОЛОВИ ТА ШИЇ

О.М. Хижняк

ДНІПРОПЕТРОВСЬКА ДЕРЖАВНА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ

Поверхневі глікокон'югати виконують функцію інформаційних молекул, забезпечують функції адгезії, міграції та імунного контролю. У роботі були досліджені біохімічні характеристики L-фукозо-, β D-галактозо-, α D-манозо- та N-ацетил-D-глюкозаміновмісних поверхневих глікокон'югатів лімфоцитів у нормі та у хворих на рак органів голови та шиї з метою визначення кількісних та якісних змін гліканової складової глікокон'югатів мембран імункомпетентних клітин. Встановлено, що в онкохворих збільшується кількість лімфоцитів, що експресують на поверхні β D-галактозилі, α D-манозилі та N-ацетил-D-глюкозамінні залишки, з паралельним зниженням експресії L-фукозовмісних глікокон'югатів порівняно з нормою.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: глікокон'югати, протокова цитофлуориметрія, лімфоцити, лектини, рак.

ВСТУП. Дослідження олігосахаридного компонента глікокон'югатів поверхні плазматичних мембран клітин як біохімічного "екрану", який досить чутливо і чітко відображає стан метаболізму клітини взагалі і, особливо, процесів, які обумовлюють міжклітинне розпізнавання, адгезію, клітинний ріст тощо [3], неможливе без використання лектинів – протеїнів, спроможних специфічно впізнавати глікокон'югати та зворотно зв'язуватися з їх вуглеводною частиною без порушення ковалентної структури глікозилітного ліганду.

Метою нашого дослідження було вивчення вуглеводного компонента глікокон'югатів клітинної поверхні лімфоцитів за допомогою лектинів, що мічені флуоресцином ізотіоціанатом (ФІТЦ) за умов нормального функціонування клітин та при розвитку онкопроцесу в органах голови та шиї.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліджувані були розподілені на декілька груп: група I – контрольна, складалась із здорових людей, група II – пацієнти, хворі на рак щитоподібної залози, рак гортані та рак головного мозку різного генезу. Середній вік групи II – $(47 \pm 2,5)$ р.; в контрольній групі цей показник становив $(43,5 \pm 2,3)$ р. Обстеженню підлягали жінки і чоловіки в рівній кількості в кожній дослідній групі. Всього було досліджено 52 людини.

Для визначення лектиногістохімічних характеристик глікокон'югатів лейкоцитів ми використали лектини (кори золотого дощу

(3,1 мг/мл); конканаваліну А (4,3 мг/мл); арахісу (5 мг/мл); кореня кропиви (5 мг/мл)), кон'юговані з флуоресцином ізотіоціанатом (Лектинотест) [1, 4], що є специфічними до зазначених олігосахаридних детермінант. Дослідження проводили у протоковому цитофлуориметрі [2, 5]. Використовували протоковий цитометр PAS Partec. Особливістю PAS є запатентований метод розділення клітин білої крові на популяції без використання додаткових антитіл. Субкласи клітин, мічені ФІТЦ-лектинами, оцінювалися окремо.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Дослідження групи контролю дозволило визначити деякі особливості розподілення лектин-специфічних сайтів окремо на поверхні лімфоцитів, моноцитів та гранулярних лейкоцитів. Плазматична мембрана лімфоцитів мала майже рівномірне розподілення глікокон'югатів, що містили залишки L-фукози, α D-манози, β D-галактози та N-ацетил-D-глюкозаміну. Сайти зв'язування з лектином золотого дощу розподілялися на поверхні $(67,1 \pm 7,1)$ % ($p < 0,05$) лімфоцитів. Інтенсивність флуоресценції була неоднорідною, але кількість клітин з високою інтенсивністю експресії рецепторів до лектину складала лише $(0,4 \pm 0,04)$ % ($p < 0,05$).

Лімфоцити, поверхневі глікокон'югати яких містили α D-манозилі олігосахариди, формували 2 піки флуоресценції: помірна інтенсивність спостерігалася на $(65,7 \pm 6,9)$ % ($p < 0,05$) клітин. Кількість $con A^+$ лімфоцитів, що містили більшу кількість лектин-зв'язувальних сайтів та давали високу флуоресценцію, до-

стовірно складала (4,9±0,5) % від загальної кількості промаркованих клітин.

PNA⁺ лімфоцити у загальній структурі клітин цієї субпопуляції, що була у зразку, складала (2,4±0,3) % (p<0,05). При цьому частка клітин, які формували зону інтенсивної флуоресценції, відповідала рівню у (4,2±0,4) %. Така модель розподілення ФІТЦ-лектинів загалом на субпопуляції має кластерний характер. Клітини, які мають високий рівень флуоресценції, характеризуються високою експресією на них лектин-зв'язувальних сайтів.

Глікани плазматичних мембран лімфоцитів, що мали термінальні залишки N-ацетил-D-глюкозаміну (мітилися лектином кропиви), були присутні на (69,4±7,2) % (p<0,05) клітин цього субкласу. Як і в попередніх випадках, плазматичні мембрани лімфоцитів мали неоднакову кількість N-ацетил-D-глюкозаміновмісних олігосахаридних залишків, що виражалося в різній інтенсивності флуоресценції. На (1,5±0,1) % (p<0,05) досліджуваних одиниць, від загальної кількості флуоресцентно-мічених клітин, експресія лектинових рецепторів була високою.

При цьому (26,2±3,1) % клітин статистично вагомо не містили у складі поверхневих глікокон'югатів сайтів для зв'язування лектину кропиви.

При порівнянні рівня експресії на лімфоцитах рецепторів до лектинів, які досліджувалися, було встановлено, що у нормі серед

клітин з високим рівнем флуоресценції переважали con A (табл. 1).

Таким чином, у нормі найменшу кількість у структурі поверхневих глікокон'югатів лімфоцитів складала така, що містили βD-галактозильні олігосахаридні залишки. Глікокарта мала вигляд практично рівномірного розподілення L-фукозовмісних, αD-манозильних та N-ацетил-D-глюкозамінних олігосахаридних залишків.

Дослідження біохімічних характеристик лектин-зв'язувальних сайтів в аспекті їх розподілення та концентрації на поверхні імункомпетентних клітин встановило деякі характерні ознаки змін цих параметрів у групі досліджуваних з онкопатологією органів голови та шиї порівняно з групою контролю.

Інкубація лімфоцитів лектином золотого дощу виявила значні зміни профілю L-фукозовмісних глікокон'югатів порівняно з групою контролю. Так, кількість клітин, що мала будь-який рівень флуоресценції, складала (9,8±0,1) % (p<0,05), що, порівняно з групою контролю, було у 6,8 раза менше. При цьому поверхневі глікокон'югати, які містили L-фукозильні олігосахариди, розподілялися на клітинах в незначній кількості, що зводило до мінімуму кількість клітин з високим рівнем флуоресценції (0,1 %) (табл. 2). Крім того, всі клітини, що були LABA⁺, розподілялися у зоні з низьким рівнем флуоресценції, що свідчить про незначну кількість L-фукозовмісних глікокон'югатів на поверхні кожного лімфоцита досліджуваних II групи.

Таблиця 1 – Розподілення вуглеводних детермінант глікокон'югатів на поверхні лімфоцитів у групі контролю (M±m)

Лектинова специфічність глікокон'югатів	Абсолютна кількість клітин у зразку*	Лектин ⁺ клітини, %**	Інтенсивно-мічені клітини, %**	Лектин ⁻ клітини, %**
Лектин золотого дощу	1380±59	67,1±6,9	0,3±0,04	35,8±4,0
Конканавалін А	1188±61	69,7±7,3	3,4±0,4	26,9±2,8
Лектин арахісу	1452±68	2,4±0,3	0,1±0,01	98,9±2,1*
Лектин кропиви	1675±82	69,4±7,4	1,07±0,1	26,2±2,4

Примітка. * – p<0,001; ** – p<0,05.

Таблиця 2 – Розподілення вуглеводних детермінант глікокон'югатів на поверхні лімфоцитів у II дослідній групі (M±m)

Лектинова специфічність глікокон'югатів	Абсолютна кількість клітин у зразку*	Лектин ⁺ клітини, %**	Інтенсивно-мічені клітини, %*	Лектин ⁻ клітини, %**
Лектин золотого дощу	4203±67	9,8±1,0	0,01±0,001	92,7±6,7
Конканавалін А	4328±92	69,9±7,2	0,07±0,002	30,2±3,4
Лектин арахісу	4655±63	88,2±8,7	0,09±0,002	12,1±1,5
Лектин кропиви	4631±78	93,6±9,7	0,17±0,02	6,3±0,6

Примітка. * – p<0,001; ** – p<0,05.

Експресія con A-зв'язувальних сайтів на поверхні лімфоцитів мала незначні коливання порівняно з групою контролю. Крива флуо-

ресценції мала ознаки полімодальності, формуючи 3 піки, однак вона була різко зміщена у бік клітин, експресія αD-манозильних олігоса-

харидів на яких була незначною чи помірною. Такі клітини статистично вагомо складали (69,8±7,1) % від загальної кількості таких, що були FITC-con A⁺. Кількість лімфоцитів, які формували зону високої флуоресценції, складала лише 0,1 % при показнику у групі контролю – 3,4 %.

PNA⁺ лімфоцити II групи, яка досліджувалася, мали ознаки різкої зміни глікокон'югатного профілю, що відбивалося як у зміні кількості лектин-позитивних активних центрів на плазматичних мембранах, так і у структурі розподілення клітин з різним рівнем експресії βD-галактозильних олігосахаридів. З-пікова крива флуоресценції PNA⁺ лімфоцитів була різко зміщена у бік низької флуоресценції. Причому відсоток клітин, що мали високий рівень флуоресценції, складав 0,2 % від загальної кількості клітин, які містилися лектином арахісу.

Порівняно з групою контролю кількість лімфоцитів, які мали будь-який рівень експресії PNA-зв'язувальних центрів, була у 40 разів більшою, що свідчить, найімовірніше, про демаскування залишків βD-галактози у складі поверхневих глікокон'югатів сіаловими кислотами.

Аналіз розповсюдженості клітин, що зв'язували лектин кропиви, у II дослідній групі показав певні відмінності порівняно з іншими групами. У загальній структурі лектин-позитивних плазматичних мембран лімфоцитів, що візуалізувалися при обробці лектином, специфічним на глікани з залишками N-ацетил-D-глюкозаміну, кількість одиниць, які формували зону з низьким та помірним рівнем флуоресценції, складала (93,3±5,1) % (p<0,001). Рівень флуоресценції плазматичних мембран лімфоцитів, що мав вигляд з-пікової кривої, був зміщений у бік клітин з низькою кількістю лектин-зв'язувальних центрів.

При порівнянні цих даних з даними у групі контролю виявилось, що відсоток лімфоцитів, які не мали ніякого рівня флуоресценції, тобто були лектин-негативними, достовірно дорівнював у II групі (6,3±0,6) %, тоді як у групі контролю цей показник становив (26,2±3,0) %. Таким чином, аналіз поверхні лімфоцитів у II дослідній групі виявив такі ознаки: зниження кількості вуглеводних детермінант до лектину золотого дощу (L-фукозоспецифічного) з паралельним зростанням лектин-зв'язувальних центрів, що є PNA-позитивними (зростання βD-галактозильних термінальних залишків), а також тих, які містилися лектином кропиви (специфічним до N-ацетил-D-глюкозамінних гліканів). Крім того, con A⁺ лімфоцити мали менший рівень експресії лектин-рецепторних активних центрів порівняно з групою контролю.

ВИСНОВКИ. 1. В онкохворих спостерігається зміна кількісного та якісного складу вуглеводного компонента поверхневих глікокон'югатів рецепторного апарату лімфоцитів.

2. Для пошуку маркерів розвитку онкологічного захворювання будь-якої локалізації можливе використання протокової цитофлуориметрії з застосуванням лектинів, специфічних до кінцевих залишків L-фукози, βD-галактози, αD-манози та N-ацетил-D-глюкозамінвмісних вуглеводних компонентів поверхневих глікокон'югатів мембран лімфоцитів.

3. У досліджуваних з онкозахворюваннями на поверхні лімфоцитів відбувалося зниження кількості L-фукозовмісних вуглеводних детермінант з паралельним зростанням термінальних βD-галактозильних, αD-манозильних та N-ацетил-D-глюкозамінних залишків олігосахаридів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Антонюк В.О. Лектини та їх сировинні джерела. – Львів, 2005. – 554 с.
2. Клетки крови – современные технологии их анализа / Г.И. Козинец, В.М. Погорелов, Д.А. Шмаров [и др.]. – М.: Триада-Фарм, 2002. – 534 с.
3. Лукьянов П.А., Журавлева Н.В. Современная гликобиология и медицина // Вестн. ДВО РАН. – 2004. – № 3. – С. 24-34.
4. Луцик М.Д., Панасюк Е.Н., Луцик А.Д. Лектины. – Львов: Вища шк., 1981. – 215 с.
5. Shapiro H.M., Nebe-von-Caron G. Multiparameter flow cytometry of bacteria // Methods Mol. Biol. – 2004. – 263. P. 33-44.

ГЛИКОЗИЛИРОВАННОСТЬ ПОВЕРХНОСТНЫХ ГЛИКОКОНЬЮГАТОВ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК ПРИ НОВООБРАЗОВАНИЯХ ГОЛОВЫ И ШЕИ

А.Н. Хижняк

ДНЕПРОПЕТРОВСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ

Резюме

Поверхностные гликоконъюгаты выполняют функцию информационных молекул, обеспечивают функции адгезии, миграции и иммунного контроля. В работе были исследованы биохимические характеристики L-фукозо-, β D-галактозо-, α D-манозо- и N-ацетил-D-глюкозаминсодержащих поверхностных гликоконъюгатов лимфоцитов в норме и у больных раком органов головы и шеи с целью определения количественных и качественных изменений гликановой составляющей гликоконъюгатов мембран иммуннокомпетентных клеток. Установлено, что у онкобольных увеличивается количество лимфоцитов, экспрессирующих на поверхности β D-галактозильные, α D-манозильные и N-ацетил-D-глюкозаминные остатки, с параллельным снижением экспрессии L-фукозосодержащих гликоконъюгатов по сравнению с нормой.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гликоконъюгаты, проточная цитофлуориметрия, лимфоциты, лектины, рак.

GLYCOSYLATION OF SUPERFICIAL GLYCOCONJUGATES OF IMMUNE-COMPETENT CELLS AT ONCOPATHOLOGY OF HEAD AND NECK

О.М. Khyzhnyak

DNIPROPETROVSK STATE MEDICAL ACADEMY

Summary

Superficial glycoconjugates execute the function of informative molecules, provide the functions of adhesion, migration and immune control. Biochemical characteristics of L-fucosyl-, β D-manosyl-, α D-galactosyl- and N-acetyl-D-glucosamino-containing superficial glycoconjugates of lymphocytes in a norm and at patients with the cancer of head organs and neck with the purpose to determine the quantitative and qualitative modifications of glycane constituent of glycoconjugates membranes of immune competent cells were explored at this assignment. It has been found out that for patients with oncological pathology the amount of lymphocytes, which is expressed on a surface, β D-manosyl, α D-galactosyl and N-acetyl-D-glucosamine-containing glycanes, along with the decline an expression of L-fucosyl-containing glycoconjugates is increased, comparatively with a norm.

KEY WORDS: glycoconjugates, flow cytometry, lymphocytes, lectines, cancer.

Отримано 16.09.2009 р.

Адреса для листування: О.М. Хижняк, вул. Б. Хмельницького, 27, кв. 93, Дніпропетровськ, Україна.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

АНАЛІЗ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНА PSA З МЕТОЮ РАННЬОЇ ДІАГНОСТИКИ РАКУ ПЕРЕДМІХУРОВОЇ ЗАЛОЗИ

Н.І. Вдовіченко, Л.І. Воробйова, Ю.Є. Мікулінський, В.Є. Кульшин
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ В.Н. КАРАЗІНА

Метою нашого дослідження було визначити наявність вільної мРНК гена PSA у сироватці крові як додаткового діагностичного маркера у хворих з гіперплазією та раком простати. Отримано теоретичні передумови для застосування даного методу при діагностиці раку передміхурової залози.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: рак передміхурової залози, простатичний специфічний антиген, мРНК PSA.

ВСТУП. Проблема раку передміхурової залози (РПЗ) набула на сьогодні особливої актуальності завдяки неухильному зростанню захворюваності та смертності, а також у зв'язку з труднощами своєчасної діагностики. Вірогідність виявлення раку простати у чоловіків віком від 60 до 79 років становить 1-6 (15,6 %). В цілому близько 3 % чоловіків ризикують померти від раку передміхурової залози. У зв'язку з введенням у повсякденну практику діагностики пухлинного маркера – простатоспецифічного антигену (ПСА) значно збільшилася частота виявлення безсимптомних форм раку простати. Однак ПСА не є суто специфічним маркером для раку передміхурової залози, зростання його рівня також може спостерігатися при доброякісній гіперплазії та простатиті. Тест на ПСА стає високочутливим тільки при значеннях, більших 20 нг/мл. Для проведення радикального лікування раку простати необхідне виявлення цього захворювання на ранніх стадіях, тоді як більшість випадків локалізованого раку припадає на так звану "сіру зону" зі значеннями ПСА 4-10 нг/мл. З метою збільшення діагностичної цінності тесту на ПСА, особливо при потребі виявлення пухлини на ранніх стадіях, ми вивчали наявність вільної мРНК гена PSA в сироватці крові як додаткового діагностичного маркера [1, 2].

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Об'єктом дослідження була сироватка крові чоловіків віком 56-78 років. Кількість обстежуваних – 89 чоловіків. Для визначення концентрації загального ПСА в сироватці крові, а також вільного ПСА (вілПСА) використовували імуноферментні тест-системи. Експресію гена PSA аналізували за допомогою виділення його РНК-продукту

із сироватки крові з наступною зворотною транскрипцією, поєднаною з полімеразно-ланцюговою реакцією (ПЛР) отриманої кДНК (ЗТ-ПЛР) та електрофорезом продукту в агарозному гелі. Отримані результати оцінювали за критерієм Фішера.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. На рисунку 1 наведено результати вивчення рівня мРНК PSA у трьох клінічних групах, які були розділені за рівнем ПСА в сироватці крові обстежуваних. До 1-ї групи зі значеннями ПСА, більшими 20 нг/мл, ввійшли хворі на рак передміхурової залози; до 2-ї експериментальної групи з ПСА 10-20 нг/мл – хворі з гіперплазією і можливим раком простати; до 3-ї – клінічно здорові чоловіки з ПСА до 2 нг/мл.

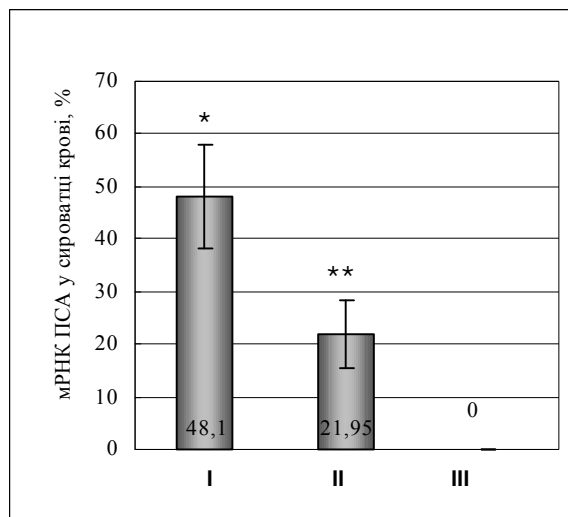


Рис. 1. Наявність мРНК ПСА в сироватці крові пацієнтів трьох клінічних груп: * – результати достовірно відрізняються порівняно з 2 і 3 групами ($p < 0,01$); ** – результати достовірно відрізняються порівняно з 3 групою ($p < 0,05$).

У 1-й групі (ПСА > 20 нг/мл) мРНК PSA було виявлено в 48,1 % випадків, у 2-й (ПСА 10-

20 нг/мл) – у 21,95 %, в контрольній групі здорових чоловіків мРНК PSA у сироватці крові не виявлено.

Ми також проаналізували наявність мРНК у підгрупах з різним співвідношенням вілПСА до загального ПСА. Дослідження проводили на сироватці крові пацієнтів 2-ї групи з рівнем ПСА 10-20 нг/мл. На підставі даного тесту ми виділили три підгрупи: а) вміст вілПСА до 10 % (рак передміхурової залози); б) 10-15 % вілПСА (“сіра зона”); с) 16-25 % вілПСА (доброякісна гіперплазія передміхурової залози).

У підгрупі а рівень мРНК достовірно вищий, ніж в підгрупах б і с, й дорівнює, відповідно, 47,1 % у 1-й підгрупі, 6,3 % у 2-й, в 3-й підгрупі мРНК PSA не виявили. Наведені вище результати представлено на рисунку 2.

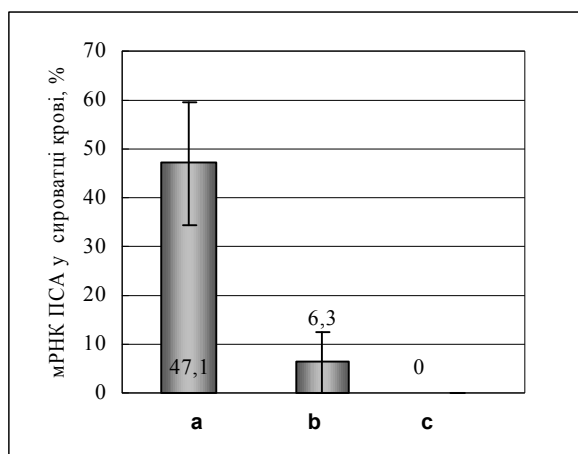


Рис. 2. Наявність мРНК PSA в сироватці крові чоловіків з гіперплазією і можливим раком передміхурової залози (ПСА 10-20 нг/мл): * – результати достовірно відрізняються порівняно з підгрупами б і с ($p < 0,01$).

ЛІТЕРАТУРА

1. Алгоритм ранньої діагностики рака предстательної залози // Урологія и нефрологія. – 2003. – № 9. – С. 3-16.
2. Воробьев А.В. Скрининг мужского населения, стандартное обследование пациентов, классификация рака предстательной железы // Практическая онкология. – 2001. – № 2. – С. 8-16.

Можна припустити, що внаслідок нестійкості мРНК, її швидкої деградації відсоток у 1-й групі (хворі на рак простати) відносно невеликий. Рівень мРНК в сироватці крові пропорційний масі пухлини та наявності метастазів. Відсутність хибнопозитивних результатів свідчить про високу специфічність даного методу.

У роботі [3] ЗТ-ПЛР гена PSA проводили на зразках сироватки крові пацієнтів перед та після простатектомії, які виявилися позитивними в 27 й 12 % випадків відповідно. Також було показано, що передопераційна ЗТ-ПЛР PSA не пов'язана з характеристиками РПЗ і результатом захворювання, а позитивне постопераційне визначення ЗТ-ПЛР PSA асоційоване з екстракапсуляцією пухлини ($p=0,044$) та втягненням сім'яних пухирців у пухлинний процес ($p=0,024$). Крім того, постопераційна ЗТ-ПЛР PSA є незалежним маркером для прогнозування прогресування захворювання ($p=0,027$). Усього було обстежено 214 чоловіків.

Дуже важливо прогнозувати ризик поширення пухлини за межі органа. Саме тому визначення рівня мРНК ПСА може мати значення в післяопераційному моніторингу.

ВИСНОВКИ. У міру малігнізації пухлини ПСА активно надходить з епітеліальних клітин у кров, його концентрація в крові підвищується. При доброякісній гіперплазії не відбувається вираженої перебудови органа зі збільшенням ангиогенезу. В поєднанні з іншими маркерами мРНК PSA можна успішно використовувати для диференційної діагностики РПЗ та гіперплазії.

3. Shariat S.F., Kattan M.W., Song W. Early postoperative peripheral blood reverse transcription PCR assay for prostate-specific antigen is associated with prostate cancer progression in patients undergoing radical prostatectomy // Cancer Research. – 2003. – 63. – P. 5874-5878.

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА PSA С ЦЕЛЬЮ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Н.И. Вдовиченко, Л.И. Воробьева, Ю.Е. Микулинский, В.Е. Кульшин
ХАРЬКОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ В.Н. КАРАЗИНА

Резюме

Целью нашего исследования было определить наличие свободной мРНК гена PSA в сыворотке крови как дополнительного диагностического маркера у больных с гиперплазией и раком простаты. Получены теоретические предпосылки для применения данного метода при диагностике рака предстательной железы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **рак предстательной железы, простатический специфический антиген, мРНК PSA.**

ANALYSIS OF PSA GENE EXPRESSION WITH THE PURPOSE OF EARLY PROSTATE CANCER DIAGNOSTICS

N.I. Vdovichenko, L.I. Vorobyova, Yu.Ye. Mikulinsky, V.Ye. Kulshyn
KHARKIV NATIONAL UNIVERSITY BY V.N. KARAZIN

Summary

The aim of our research was to detect the presence of free mRNA of PSA gene in blood serum as an additional diagnostic marker in patients with prostate hyperplasia and cancer. Our data prove the potential significance of this method application at prostate cancer diagnostics.

KEY WORDS: **prostate cancer, prostatic specific antigene, mRNA of PSA.**

Отримано 16.09.2009 р.

Адреса для листування: Н.І. Вдовіченко, вул. Дружби народів, 277, кв. 82, Харків, 61183, Україна.

ЖИРНОКИСЛОТНИЙ СКЛАД МІТОХОНДРІЙ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ШЛУНКА ЩУРІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ВИРАЗКИ

К.О. Дворщенко, С.А. Сенін, І.С. Бездольна, Ю.В. Степанов
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

Встановлено, що при експериментальній виразці у мітохондріях слизової оболонки шлунка знижувався вміст ненасичених жирних кислот ліпідів, що свідчить про інтенсифікацію вільнорадикальних процесів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: виразка шлунка, мітохондрії, перекисне окиснення ліпідів.

ВСТУП. Велике значення при розвитку виразкової хвороби має порушення в епітеліоцитах шлунка гомеостазу, якому сприяє зсув рівноваги між утворенням активних форм кисню (АФК) та їх нейтралізацією. Атака ненасичених жирних кислот (ЖК) ліпідів вільними радикалами спричиняє інтенсифікацію процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), наслідком чого стає пошкодження мембран. Важливу роль у розвитку внутрішньоклітинного окисного стресу відіграють мітохондрії, які є основним джерелом утворення АФК [1, 5].

Тому метою нашої роботи було визначити спектр жирних кислот ліпідів у мітохондріях слизової оболонки шлунка щурів за умов експериментальної виразки.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. У дослідях використовували щурів лінії Вістар обох статей масою 180-230 г. Етанолову модель виразки шлунка створювали за методом [7], як стресову виразку застосовували модель іммобілізаційного водоімерсійного холодного стресу [8]. Після декапітації тварин з гомогенату слизової оболонки шлунка (СОШ) щурів виділяли мітохондрії загальноприйнятим методом [3].

Ліпіди екстрагували за методом Фолча хлороформ-метанольною сумішшю (2:1, за об'ємом) [6]. Отриманий препарат сумарних ліпідів використовували для приготування метилових ефірів ЖК. Після метилування ЖК проводили їх розділення на газовому хроматографі "Thermo Electron Corporation Finnigan TraceGC ultra" (США). Для визначення кількісного складу ЖК використовували метод внутрішньої нормалізації [2].

© К.О. Дворщенко, С.А. Сенін, І.С. Бездольна, Ю.В. Степанов, 2009.

Статистичну обробку результатів дослідження проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики [4]. Вірогідність різниці між контрольними та дослідними вимірами оцінювали за t-критерієм Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Показано, що при експериментальній моделі етанолової виразки знижувався вміст насичених ЖК ліпідів мітохондрій СОШ, зокрема міристинової ($C_{14:0}$), пентадецилової ($C_{15:0}$) та бегенової ($C_{22:0}$) (табл. 1).

Паралельно з цим рівень маргаринової та стеаринової ЖК зростає, відповідно, на 47 та 23 % порівняно з контрольними показниками. У мітохондріальній фракції СОШ збільшувалась кількість таких ненасичених ЖК: пальмітолеїнової ($C_{16:1}$) – у 2,1 раза, гептадеценової ($C_{17:1}$) – в 3 рази, ейкозадієнової ($C_{20:2}$) – в 1,4 раза та додекадієнової ($C_{22:2}$) – в 1,8 раза відносно контролю. Також за умов дії етилового спирту знижувалась кількість таких поліненасичених ЖК: ейкозатриєнової ($C_{20:3}$) – на 21 %, лінолевої ($C_{18:3}$) – на 21 %, арахідонової ($C_{20:4}$) – на 19 % та докозагексаєнової ($C_{22:6}$) – на 39 % відносно контролю, при цьому гондоїнова, докозатетраєнова та докозапентаєнова ЖК взагалі зникали (табл. 1).

Встановлено, що при стресовій виразці рівень насичених ЖК ліпідів мітохондрій СОШ знижувався (табл. 1): міристинової ($C_{14:0}$) – на 74 %, пентадецилової ($C_{15:0}$) – на 79 %, пальмітинової ($C_{16:0}$) – на 38 %, стеаринової ($C_{18:0}$) – на 43 %, арахінової ($C_{20:0}$) – на 32 %, бегенової ($C_{22:0}$) – на 46 % відносно контролю. При дії стресу на щурів збільшувалась кількість таких ненасичених ЖК мітохондрій: олеїнової ($C_{18:1}$) – на 49 %, лінолевої ($C_{18:2}$) – на 88 %, ліноле-

Таблиця 1 – Вміст жирних кислот ліпідів (% від загальної кількості) у мітохондріях слизової оболонки шлунка за умов виразки ($M \pm m$, $n=10$)

Умовне позначення жирної кислоти	Назва жирної кислоти згідно з тривіальною номенклатурою	Контроль	Етанол	Стрес
C _{14:0}	Міристинова	0,70±0,06	0,48±0,04*	0,18±0,01*
C _{15:0}	Пентадецилова	1,36±0,12	0,88±0,08*	0,29±0,02*
C _{16:0}	Пальмітинова	27,29±2,53	24,72±2,15	16,77±1,47*
C _{16:1 ω9}	Пальмітолеїнова	0,67±0,06	1,39±0,12*	0,56±0,05
C _{17:0}	Маргарінова	0,37±0,03	0,56±0,05*	0,41±0,03
C _{17:1}	Гептадецена	0,38±0,03	1,14±0,13*	0,21±0,02*
C _{18:0}	Стеаринова	17,13±1,68	21,03±1,96*	9,74±0,83*
C _{18:1 ω9}	Олеїнова	18,02±1,62	16,77±1,52	26,80±2,36*
C _{18:2 ω6}	Лінолева	11,23±1,05	11,21±1,07	21,09±1,89*
C _{18:3 ω6}	Ліноленова	0,67±0,06	0,53±0,04*	6,49±0,61*
C _{20:0}	Арахідова	1,22±0,11	1,33±0,13	0,83±0,07*
C _{20:1}	Гондоїнова	0,90±0,08	–	3,09±0,28*
C _{20:2}	Ейкозадієнова	0,81±0,07	1,11±0,09*	1,44±0,14*
C _{20:3}	Ейкозатриєнова	0,53±0,05	0,42±0,04*	0,24±0,02*
C _{20:4 ω6}	Арахідонова	8,59±0,74	6,95±0,63*	5,08±0,43*
C _{21:0}	Генейкозанова	0,29±0,02	0,28±0,02	0,50±0,04*
C _{22:0}	Бегенова	2,56±0,21	1,96±0,15*	1,38±0,13*
C _{22:1}	Ерукова	0,24±0,02	0,16±0,01*	4,08±0,35*
C _{22:2}	Додекадієнова	4,15±0,37	7,49±0,68*	0,24±0,02*
C _{22:3}	Докозатриєнова	0,81±0,07	0,73±0,07	0,20±0,02*
C _{22:4}	Докозатетраєнова	0,26±0,02	–	–
C _{22:5 ω6}	Докозапентаєнова	0,40±0,03	–	–
C _{22:6 ω3}	Докозагексаєнова	1,42±0,12	0,86±0,07*	0,38±0,03*

Примітка. * – $p \leq 0,05$ відносно контролю.

нової (C_{18:3}) – у 9,7 раза, гондоїнової (C_{20:1}) – у 3,4 раза, ейкозадієнової (C_{20:2}) – в 1,8 раза порівняно з контролем.

Було показано, що при впливі на щурів стресового фактора у мітохондріях СОШ зменшувався рівень таких ненасичених ЖК: пальмітолеїнової (C_{16:1}) – на 16 %, гептадецена (C_{17:1}) – на 45 %, ейкозатриєнової (C_{20:3}) – на 55 %, арахідонової (C_{20:4}) – на 41 %, додекадієнової (C_{22:2}) – на 96 % та докозатриєнової (C_{22:3}) – на 75 % відносно контрольних показників. Докозатетраєнова та докозапентаєнова ЖК були відсутні (табл. 1).

ВИСНОВКИ. Зміни жирнокислотного складу ліпідів мітохондрій СОШ щурів при експериментальній виразці свідчать про структурно-функціональні перебудови у мембранах.

Зростання процента таких основних ненасичених ЖК, як олеїнова, лінолева та додекадієнова, збільшує всі показники лабільності мітохондріальних мембран. Це може призвести до підвищення латеральної дифузії компонентів мембрани за рахунок зменшення взаємодії між молекулами, збільшення дифузії відповідних речовин (наприклад неполярних сполук) крізь мембрану в зв'язку зі зростанням проміжків між "хвостами" ліпідів, підвищення здатності мембран до розриву. Зрозуміло, що всі ці зміни викликають дестабілізацію мембран мітохондрій. Паралельно відмічено зменшення вмісту такої поліненасиченої ЖК, як арахідонова, яка є основним субстратом ПОЛ, що свідчить про інтенсифікацію вільнорадикальних процесів у мітохондріальних мембранах.

ЛІТЕРАТУРА

1. Владимиров Ю.А. Биологические мембраны и незапрограммированная смерть клетки // Сорос. образов. жур. – 2000. – **6**, № 9. – С. 2-9.
2. Медведовская И.И., Воронцова М.А. Хроматографический анализ: Практикум. – Изд-во “Омск” ОмГУ, 2002. – 76 с.
3. Практикум по биохимии / Под ред. С.Е. Северина и Г.А. Соловьевой. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1989. – С. 406.
4. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. – М.: Информполиграф, 2002. – 305 с.
5. Свиницкий А.С., Соловьева Г.А. Патогенез язвенной болезни в свете современных представлений // Сучасна гастроентерол.і гепатол. – 2000. – Вып. 1. – С. 26-28.
6. Folch J., Lees M., Stanley G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues // J. Biol. Chem. – 1957. – **226**. – P. 497-509.
7. Robert A., Nezamis J.E., Lancaster C., Hanchar A.J. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl, and thermal injury // Gastroenterology. – 1979. – **77** (3). – P. 433-443.
8. Takagi K., Okabe S. The effects of drugs on the production and recovery process of the stress ulcer // J. Pharmacol. – 1968. – **18**. – P. 9-18.

ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ МИТОХОНДРИЙ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЯЗВЕ

Е.А. Дворщенко, С.А. Сенин, И.С. Бездольная, Ю.В. Степанов
КИЕВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ТАРАСА ШЕВЧЕНКО

Резюме

Установлено, что при экспериментальной язве в митохондриях слизистой оболочки желудка снижалось содержание ненасыщенных жирных кислот липидов, что свидетельствует об интенсификации свободнорадикальных процессов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **язва желудка, митохондрии, перекисное окисление липидов.**

SPECTRUM OF FATTY ACIDS OF STOMACH MUCOSA MITOCHONDRIA OF RATS AT EXPERIMENTAL ULCER

K.O. Dvorshchenko, S.A. Senin, I.S. Bezdolna, Yu.V. Stepanov
KYIV NATIONAL UNIVERSITY BY TARAS SHEVCHENKO

Summary

It was fixed that at an experimental ulcer in stomach mucosa mitochondria of rats the content of unsaturated fatty acids of lipids was decreased that testifies to an intensification of free-radical processes.

KEY WORDS: **stomach ulcer, mitochondria, lipid peroxidation.**

Отримано 24.09.2009 р.

Адреса для листування: К.О. Дворщенко, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, просп. Глушкова, 12/2, Київ, Україна.

ЗМІНИ АКТИВНОСТІ МІДЬЗАЛЕЖНИХ АНТИОКСИДАНТНИХ ФЕРМЕНТІВ ТА РОЗВИТОК НІТРОЗАТИВНОГО СТРЕСУ В ОБПЕЧЕНИХ

Г.О. Федорова¹, Б.Г. Борзенко²

ІНСТИТУТ НЕВІДКЛАДНОЇ ТА ВІДНОВНОЇ ХІРУРГІ ІМЕНІ В.К. ГУСАКА АМН УКРАЇНИ¹, ДОНЕЦЬК
ДОНЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ М. ГОРЬКОГО²

Зміни активності мідьзалежних антиоксидантів (Cu-Zn-супероксиддисмутази та церулоплазміну) впливають на утворення токсичних та корисних метаболітів NO, які відіграють важливу роль в адаптації організму до гіпоксичних явищ та порушень мікроциркуляції в гострий період опікової хвороби. Ці показники антиоксидантного захисту та нітрозативного стресу змінюються залежно від тяжкості стану обпечених. Поступове підвищення вмісту церулоплазміну, незначні коливання активності супероксиддисмутази та сумарної концентрації нітратів/нітритів характеризують більш швидке відновлення гемодинаміки у постраждалих з опіковим шоком середньої тяжкості.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: мідьзалежні антиоксиданти, нітрозативний стрес, опіковий шок.

ВСТУП. Розвиток всіх видів гіпоксії є однією з головних патогенетичних ланок при опіковому шоці (ОШ). Порушення нормального перебігу киснезалежних реакцій провокує оксидативний стрес, який, як правило, розвивається одночасно з нітрозативним [1, 3, 5]. Важливу роль у захисті клітин від вільних радикалів кисню відіграє Cu-Zn-залежна супероксиддисмутаза (СОД). Найвищу здатність до нітрування амінокислот має токсичний метаболіт оксиду азоту – пероксинітрит (ПН), який утворюється при взаємодії NO та супероксидного аніон-радикала O_2^- . Можна говорити про конкуренцію за O_2^- між NO та СОД [3]. Гіпоксичні явища також стимулюють нітратредуктазну активність еритроцитів, внаслідок чого спостерігається підвищення рівня нітритів, які необхідні для генерації NO з метою покращення кровопостачання тканин [5]. Нітрит-аніон також утворюється при окисненні оксиду азоту з участю основного білка в обміні міді – церулоплазміну (ЦП). За присутності іонів міді також відбувається генерація NO з нітрозотіолів [8]. В умовах оксидативного стресу СОД може втрачати іони міді, що знижує її активність та одночасно сприяє підвищенню кількості O_2^- [5]. Отже, порушення в активності СОД та концентрації церулоплазміну мають безпосередній вплив на утворення токсичних та корисних в умовах гіпоксії метаболітів оксиду азоту при опіковому шоці.

Метою даного дослідження було виявити зміни активності мідьзалежних антиоксидантів при розвитку нітрозативного стресу в обпечених.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Було обстежено 44 обпечених в першу добу ОШ та на третю добу після травмування при виході з шоку на стадії гострої опікової токсемії (ГОТ). Всі вони потрапили до Донецького опікового центру в 2008-2009 рр. внаслідок шахтних травм при вибуху метано-вугільної суміші. Залежно від тяжкості ОШ пацієнтів було поділено на дві групи: 1-ша – постраждалі з ОШ середнього ступеня тяжкості (n=23), 2-га – хворі з тяжким ОШ (n=21). Ступінь тяжкості ОШ визначали за допомогою модифікованого індексу тяжкості опікової травми [7]. Також дослідили 15 здорових донорів (група контролю).

Для оцінки нітрозативного стресу та антиоксидантного захисту (АОЗ) клітин у крові пацієнтів з опіковим шоком досліджували такі показники: активність СОД, концентрацію церулоплазміну та сумарну концентрацію нітратів/нітритів (NO_x).

Рівень NO_x визначали спектрофотометрично за реакцією з реактивом Грісса. Для відновлення нітратів у нітрити сироватку крові обробляли сумішшю цинку та $MnSO_4$ [6]. Активність СОД в гемолізаті еритроцитів оцінювали за її здатністю інгібувати аутоокиснення адреналіну, кінетику якого вимірювали спектрофотометрично [4]. Вміст церулоплазміну в сироватці крові розраховували за оптичною щільністю

© Г.О. Федорова, Б.Г. Борзенко, 2009.

продуктів, які утворюються при окисненні п-фенілендіаміну з участю ЦП [2].

Для статистичної обробки результатів використовували програму "Microsoft Excel". Результати виражали як середнє ± стандартна похибка середнього. Вірогідність між групами оцінювали за t-критерієм Стьюдента, вірогідними вважали відмінності лише за умови $p < 0,05$. Взаємозв'язок між показниками виявляли за коефіцієнтом кореляції Пірсона.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Підвищення концентрації NO_x в обпечених 1-ї групи було обернено пропорційне зменшенню вмісту ЦП ($r = -0,3$ при ОШ, $r = -0,43$ при ГОТ).

Але активність СОД достовірно не змінювалась. Значне (майже в 2 рази) зниження концентрації ЦП під час ОШ одночасно з достовірним підвищенням NO_x , на нашу думку, буде сприяти розвитку як оксидативного, так і нітрозативного стресів. Таке зменшення рівня ЦП свідчить не тільки про певне інгібування АОЗ, але також про порушення обміну міді, іони якої є дуже необхідними для реалізації позитивних фізіологічних ефектів оксиду азоту. Достовірно зростання концентрації ЦП на стадії ГОТ ми розглядаємо як часткове відновлення адаптаційних реакцій, яке клінічно характеризується нормалізацією показників гемодинаміки (табл. 1).

Таблиця 1 – Показники антиоксидантного захисту та нітрозативного стресу в обпечених

Група обстежених		Концентрація церулоплазміну, мг/л	Активність СОД, Од/мл	Концентрація NO_x , мкмоль/л
Група контролю		300±30	11,6±0,10	6,17±0,64
1-ша група (n=23)	ОШ	157±13	11,6±0,15	8,56±1,07
	ГОТ	194±13	11,6±0,2	8,04±0,64
2-га група (n=21)	ОШ	188±12*	11,9±0,13	7,7±1,16
	ГОТ	186±11	12,3±0,12*	9,39±0,78

Примітка. * – достовірна відмінність показників у 1-й та 2-й групах ($p < 0,05$).

У важкообпечених спостерігається поступове підвищення активності СОД та вмісту NO_x , але концентрація ЦП залишається низькою. Такі зміни передусім відображають посилену генерацію активних форм кисню та розвиток оксидативного стресу. При цьому знижена інтенсивність метаболізму міді сприяє утворенню токсичних метаболітів оксиду азоту, що може призводити до посилення реакцій нітрування білків та поглиблення нітрозативного стресу.

ВИСНОВКИ. 1. У пацієнтів з тяжким і середньої тяжкості ОШ спостерігається знижений вміст церулоплазміну в сироватці крові впро-

довж перших 3-х діб після травми, що свідчить про порушення обміну міді, іони якої є необхідними для утворення нетоксичних форм NO .

2. Значне підвищення активності СОД та рівня NO_x у важкообпечених відображає істотне поглиблення оксидативного та нітрозативного стресів у цій групі порівняно з постраждалими з ОШ середньої тяжкості.

3. Дослідження змін мідьзалежних показників АОЗ та сумарної концентрації нітратів/нітритів дозволяє мати чіткіші уявлення про глибину та спрямованість порушень окиснювальних реакцій, які відіграють важливу роль у процесах відновлення гемодинаміки у хворих з опіками.

ЛІТЕРАТУРА

1. Голиков П.П. Оксид азота в клинике неотложных заболеваний. – М.: Медпрактика, 2004. – 180 с.
2. Горячковский А.М. Клиническая биохимия. – Одеса: Астропринт, 1998. – 608 с.
3. Дмитренко Н.П., Холиан А. Роль взаимодействия путей метаболизма формальдегида и оксида азота в механизме их токсического действия. 2. Токсическое действие оксида азота // Укр. біохім. журн. – 2005. – 77, № 5. – С. 5-20.

4. Доронина О.А., Бурлев В.А., Бахарев В.А. Определение активности Cu/Zn-супероксиддисмутазы и пренатальная диагностика синдрома Дауна // Пробл. репродукции. – 1996. – № 4. – С. 71-74.

5. Каминская Л.Ю., Жлоба А.А., Моисеев О.М. и др. Влияние донатора NO нитрозотиола глутатиона на уровень окислов азота и малонового диальдегида в крови крыс // Артер. гипертензия. – 2005. – 11, № 1. – С. 1-3.

6. Кіселик І.А., Луцик М.Д., Шевченко Л.Ю. Особливості визначення нітратів та нітритів у крові хворих на вірусні гепатити та жовтяниці іншої етіології // Лаб. діагностика. – 2001. – № 3. – С. 43-45.

7. Фисталь Э.Я., Самойленко Г.Е., Лаврухин Ю.Н., Носенко В.М. Прогностический индекс тяжести ком-

бинированной ожоговой травмы // Травма. – 2001. – 2, № 1. – С. 18-23.

8. Tamika K. Samuel, Jonathan D. Giltin. Copper and nitric oxide meet in the plasma // Natural chemical biology. – 2006. – № 2. – P. 452-453.

ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ МЕДЬЗАВИСИМЫХ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ И РАЗВИТИЕ НИТРОЗАТИВНОГО СТРЕССА В ОБОЖЖЕННЫХ

А.А. Федорова¹, Б.Г. Борзенко²

ИНСТИТУТ НЕОТЛОЖНОЙ И ВОССТАНОВИТЕЛЬНОЙ ХИРУРГИИ ИМЕНИ В.К. ГУСАКА АМН УКРАИНЫ¹,
ДОНЕЦК
ДОНЕЦКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ М. ГОРЬКОГО²

Резюме

Изменения активности медьзависимых антиоксидантов (Cu-Zn-супероксиддисмутазы и церулоплазмينا) влияют на образование токсических и полезных метаболитов NO, которые играют важную роль в адаптации организма к гипоксическим явлениям и нарушениям микроциркуляции в остром периоде ожоговой болезни. Данные показатели антиоксидантной защиты и нитрозативного стресса изменяются в зависимости от тяжести состояния обожженных. Постепенное повышение содержания церулоплазмينا, незначительные колебания активности супероксиддисмутазы и суммарной концентрации нитратов/нитритов характеризуют более быстрое восстановление гемодинамики у пострадавших с ожоговым шоком средней тяжести.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: медьзависимые антиоксиданты, нитрозативный стресс, ожоговый шок.

ALTERATIONS OF COPPER-DEPENDENT ANTIOXIDANTIVE ENZYMES ACTIVITY AND NITROSATIVE STRESS DEVELOPMENT IN BURN PATIENTS

Н.О. Fedorova¹, В.Н. Borzenko²

INSTITUTE OF URGENT AND RECOVERY SURGERY BY V.K. HUSAK OF AMS OF UKRAINE¹, DONETSK
DONETSK NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY BY M. HORUKY²

Summary

Alteration of copper-dependent antioxidants activity such as Cu-Zn-superoxide dismutase and ceruloplasmin affects on toxic and beneficial NO metabolites formation, which plays an important role for hypoxia and impaired microcirculation adaptation of tissues for acuity of burn disease. These indexes of nitrosative stress and antioxidant protection are changed depending on severity of burn patient state. Progressive increasing of ceruloplasmin level and insignificant variances of superoxide dismutase activity and summarizing concentration of nitrates/nitrites distinguishes more rapid circulatory dynamics recovery in patients by moderate burn shock.

KEY WORDS: copper-dependent antioxidants, nitrosative stress, burn shock.

Отримано 24.09.2009 р.

Адреса для листування: Г.О. Федорова, Інститут невідкладної та відновної хірургії імені В.К. Гусака АМН України, пров. Орешкова, 15-25, Донецьк, Україна.

СТАН ФЕРМЕНТАТИВНОЇ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ В ТКАНИНАХ ЩУРІВ ЗА УМОВ НАДМІРНОГО ХАРЧУВАННЯ

Ю.В. Нікітченко, В.М. Дзюба, А.С. Попович, В.В. Бондар, Г.О. Шеремет
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ В.Н. КАРАЗІНА

Встановлено, що за умов надмірного харчування в ранній період постнатального онтогенезу в щурів спостерігалося вірогідне зростання концентрації T_4 і вмісту гідроперекисів ліпідів у крові й печінці. При цьому в піддослідних тварин відбувалося істотне зниження концентрацій GSSG та GSH, супероксиддисмутази та Se-залежної глутатіонпероксидази активностей у печінці та крові.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: надмірне харчування, антиоксидантні ферменти, тиреоїдні гормони, щури.

ВСТУП. Як свідчать літературні джерела, надмірне харчування щурів у ранній період постнатального онтогенезу скорочує максимальну тривалість життя (ТЖ) [4]. Конкретні механізми впливу надмірного харчування на ТЖ не відомі. Проте накопичені експериментальні дані свідчать про істотну роль ферментативної антиоксидантної системи в механізмах виникнення та розвитку вікових патологій і старіння в цілому.

Метою цієї роботи було дослідити зміни ферментативної антиоксидантної системи печінки та крові щурів при застосуванні надмірного харчування у ранній період постнатального онтогенезу.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проведено на щурах-самцях лінії Вістар відповідно до правил Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та наукових цілей (Страсбург, 1986). Надмірне харчування тварин у ранній період постнатального онтогенезу моделювали, як описано [4]. Щурів декапітували під ефірним наркозом. Із зібраної крові отримували сироватку, а з ізольованої печінки – гомогенати, мітохондрії (МХ) та постмітохондріальну фракцію (ПМХ).

Вміст гідроперекисів ліпідів (ГПЛ) у фракціях печінки визначали за методом Ohkawa et al., а в сироватці крові – за методом Asakawa et al. Глутатіонпероксидазу (ГП) активність

визначали з екзогенною глутатіонредуктазою (ГР), глутатіон-S-трансферазу (ГТ) активність – з 1-хлор-2,4-динітробензолом. Супероксиддисмутазу (СОД) активність вимірювали за ступенем інгібування утворення формагану в ксантин-ксантинооксидазній реакції. Вміст ферментативно активного церулоплазміну (ЦП) визначали за методом Ravin. Каталазу (КАТ) активність визначали за зменшенням H_2O_2 . Концентрації GSH і GSSG вимірювали з екзогенною ГР. Усі активності реєстрували на двопробеновому спектрофотометрі Specord UV VIS, як було описано раніше [2, 3]. Вміст T_3 та T_4 в сироватці крові визначали радіоімунологічним методом. Вміст білка в зразках визначали за методом Lowry та співавт. у модифікації Miller. Результати обробляли статистично за допомогою програми Statistika V.6 з використанням t-критерію Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Дослідження впливу переїдання показало, що вміст T_3 в сироватці крові піддослідних щурів не змінювався, а концентрація T_4 вірогідно зростала. Зокрема, вміст T_4 у контрольних щурів складав $(70,6 \pm 3,7)$ нмоль/л, а в піддослідних тварин – $(83,2 \pm 4,4)$ нмоль/л ($n=7-8$, $p<0,05$). У зв'язку з цим, слід зазначити, що при пролонгуванні тривалості життя калорійно обмеженою дієтою вміст тиреоїдних гормонів значно зменшувався [1].

При дослідженні вмісту продуктів ПОЛ встановлено, що в сироватці крові щурів за умов надмірного харчування концентрація ГПЛ суттєво зростала (табл. 1), а в гомогенатах печі-

Таблиця 1 – Стан прооксидантно-антиоксидантного балансу в печінці та крові щурів при надмірному харчуванні (n=6)

Показник, який визначають	Контроль	Дослід
ГПЛ, гомогенат, нмоль МДА/мг білка	0,260±0,013	0,283±0,013
ГПЛ, МХ, нмоль МДА/мг білка	0,443±0,026	0,387±0,017
ГПЛ, ПМХ, нмоль МДА/мг білка	0,154±0,005	0,199±0,012 [*]
ГПЛ, сироватка, нмоль МДА/мл	2,62±0,07	2,86±0,10 [*]
КАТ, гомогенат, мкмоль Н ₂ О ₂ /хв·мг білка	320,3±23,6	304,3±13,9
СОД, гомогенат, ум. од./мг білка	621,4±28,6	515,0±23,8 [*]
ГТ, гомогенат, нмоль ХНБ/хв·мг білка	727,9±33,8	818,0±30,6
Загальна ГП, гомогенат ^{**}	212,5±8,9	181,8±9,5 [*]
Se-залежна ГП, гомогенат ^{**}	46,0±2,5	36,9±2,1 [*]
Se-незалежна ГП, гомогенат ^{**}	167,0±10,2	144,9±8,8
Se-залежна ГП, сироватка ^{**}	1540±110	1170±120 [*]
СОД, сироватка, ум. од./мл	223,6±27,3	201,6±16,5
ЦП, сироватка, нмоль/мл	1,15±0,12	1,29±0,11
GSH, гомогенат, мкмоль/г печінки	5,79±0,61	4,02±0,38 [*]
GSSG, гомогенат, мкмоль/г печінки	0,93±0,10	0,65±0,06 [*]

Примітка. * – p<0,05 порівняно з контролем; ** – нмоль NADPH/хв·мг білка (гомогенат); нмоль NADPH/хв·мл (сироватка).

нки піддослідних тварин вміст ГПЛ вірогідно не змінювався. При дослідженні вмісту цих продуктів ПОЛ у різних фракціях гомогенату печінки з'ясовано, що в МХ печінки рівень ГПЛ дещо знижувався (0,05<p<0,1), а в ПМХ – зростав на 29,2 %.

При дослідженні активності антиоксидантних ферментів, які утилізують активні форми кисню, встановлено, що зі всіх досліджених показників (КАТ, СОД, ЦП) у відповідь на надмірне харчування вірогідно зменшувалась лише СОД печінки. Разом із тим, вміст GSH та GSSG, загальна й Se-залежна глутатіонперок-

сидазна активності в печінці й крові істотно знижувались. При дослідженні активності Se-залежної ГП у різних фракціях гомогенату виявлено, що в МХ печінки вона не зазнавала суттєвих змін, а у ПМХ – вірогідно знижувалась на 21,2 % (дані не наведено).

ВИСНОВОК. У відповідь на надмірне харчування вміст ГПЛ вірогідно зростав у сироватці крові та ПМХ печінки щурів. При цьому вміст GSH та GSSG, супероксиддисмутазна і Se-залежна глутатіонпероксидазна активності в печінці й крові істотно знижувались.

ЛІТЕРАТУРА

1. Волянський А.Ю., Симиренко Л.Л., Нікітченко Ю.В. та ін. Гормональний статус щурів за умов імунізації АДП-анатоксином на тлі калорійно обмеженої дієти // Biomedical and Biosocial Anthropology. – 2007. – № 9. – С. 148-152.
2. Нікітченко Ю.В., Падалко В.И., Ткаченко В.Н. и др. Влияние γ -излучения и алиментарных факторов на прооксидантно-антиоксидантную систему печени и крови крыс // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2008. – 48, № 2. – С. 171-176.

3. Нікітченко Ю.В., Падалко В.И., Ткаченко В.М. та ін. Активність глутатіонзалежної антиоксидантної системи печінки і крові щурів залежно від γ -опромінення та раціону харчування // Укр. біохім. журн. – 2008. – 80, № 6. – С. 66-73.
4. Фролькис В.В., Григоров Ю.Г., Писарчук К.Л., Медовар Б.Я. Влияние переизбытка в постнатальном периоде на старение и продолжительность жизни // Пробл. старения и долголетия. – 1992. – 2, № 4. – С. 339-347.

СОСТОЯНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ В ТКАНЯХ КРЫС ПРИ ИЗБЫТОЧНОМ ПИТАНИИ

Ю.В. Никитченко, В.Н. Дзюба, А.С. Попович, В.В. Бондарь, А.А. Шеремет
ХАРЬКОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ В.Н. КАРАЗИНА

Резюме

Установлено, что при избыточном питании в раннем периоде постнатального онтогенеза у крыс наблюдалось достоверное возрастание концентрации T_4 и содержания гидроперекисей липидов в крови и печени. При этом у подопытных животных происходило существенное снижение концентраций GSSG и GSH, супероксиддисмутазной и Se-зависимой глутатионпероксидазной активностей в печени и крови.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **избыточное питание, антиоксидантные ферменты, тиреоидные гормоны, крысы.**

STATE OF ENZYMATIC ANTIOXIDANT SYSTEM IN RATS TISSUES UNDER OVERNUTRITION

Yu.V. Nikitchenko, V.M. Dzyuba, A.S. Popovych, V.V. Bondar, H.O. Sheremet
KHARKIV NATIONAL UNIVERSITY BY V.N. KARAZIN

Summary

The increase of concentration of T_4 and lipid hydroperoxides content in blood and liver under postnatal early overnutrition has been observed under condition of overnutrition in early period of postnatal ontogenesis. At the same time the essential decrease of GSSG and GSH concentration, superoxide dismutase and Se-dependent glutathione peroxidase activities in blood and liver of experimental rats was shown.

KEY WORDS: **overnutrition, antioxidant enzymes, thyroid hormones, rats.**

Отримано 10.09.2009 р.

Адреса для листування: А.С. Попович, б-р Богдана Хмельницького, 18, кв. 31, Харків, 61099, Україна.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

СПЕЦИФІЧНІ БІОХІМІЧНІ МАРКЕРИ МОЛЮСКІВ У ОЦІНЦІ БІОЛОГІЧНОЇ БЕЗПЕКИ

Л.Л. Гнатишина, Г.І. Фальфушинська, О.Б. Столяр

ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ ПЕДАГОГІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ВОЛОДИМИРА ГНАТЮКА

Оцінювали чутливість і селективність показників активності етоксирезорурфін О-деетилази (ЕРОД), глутатіон-S-трансферази (GST), ацетилхолінестерази (АХЕ), вмісту вітелогенінподібних білків та металотіонеїнів (МТ) у тканинах двостулкового моллюска *Anodonta cygnea* з трьох місцевостей у дві пори року. Встановили активацію ЕРОД та GST і пригнічення АХЕ в аграрній місцевості та стійкі ознаки фемінізації у самців моллюсків із ставу-охолоджувача АЕС. МТ більш імовірно були маркером оксидативного стресу, ніж забруднення важкими металами.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: двостулкові моллюски, металотіонеїни, етоксирезорурфін О-деетилаза, глутатіон-S-трансфераза, ацетилхолінестераза, вітелогенін.

ВСТУП. У зв'язку з етичними вимогами до обмеження використання хребетних тварин в експерименті та певними недоліками моделювання на культурах клітин великого значення набуває застосування як індикаторних організмів безхребетних тварин. Вплив несприятливих чинників середовища викликає специфічні біохімічні відповіді, які описано здебільшого у хребетних тварин [2]. Тому стало інтерес визначити стан систем детоксикації та гормональної активності у двостулкових моллюсків, які є популярною моделлю у виявленні забруднення природного середовища [1].

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проводили навесні та влітку 2009 р. Екземпляри двостулкового моллюска беззубки лебединої *Anodonta cygnea* L. (довжина мушлі – приблизно 8 см, маса – 30-36 г) із трьох місцевостей, умовно-чистої (с. Івачів на р. Серет, група І), з домінуванням аграрного забруднення (р. Нічлава нижче м. Борщова, група В), із ставу-охолоджувача Хмельницької АЕС (м. Нетішин, група N), досліджували не більше як через 10 год після відбору. В кожній групі було по 8 екземплярів тварин. Активність етоксирезорурфін О-деетилази (ЕРОД) визначали за утворенням резорурфіну, глутатіон-S-трансферази (GST, КФ 2.5.1.18) – за утворенням адуктів 1-хлоро-2,4-динітробензолу, ацетилхолінестерази (АХЕ, КФ 3.1.1.7) – за здатністю гідролізувати ацетилтіохолін, вміст вітелогенінподібних білків (ВтПБ) у гемолімфі самців – за утворенням лужнолабільних фосфатів, металотіонеїнів (МТ) – за концентрацією тіолів, як описано в [1]. Використовували тканину травної залози та зябер. Усі процедури проводили на холоді. Вірогідність відмінності двох рядів значень обчислювали з використанням t-тесту Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Згідно з отриманими даними (табл. 1), застосовані показники виявились високочутливими і специфічними. Особливо показовою була активація мікосомальної активності (ЕРОД та GST) у тканинах моллюсків в аграрній місцевості, що свідчить про забруднення органічними речовинами, зокрема поліциклічними ароматичними вуглеводнями та їх хлорпохідними, пригнічення активності АХЕ у цій же місцевості як ознаку нейротоксичності середовища (забруднення тіокарбаматними та фосфороорганічними пестицидами) та стійкі ознаки фемінізації у самців моллюсків із зони АЕС. Вміст МТ зростав у моллюсків груп В і N, проте ця ознака тимчасова і тканиноспецифічна, що дає підстави вважати маркером оксидативного стресу більше МТ, ніж забруднення важкими металами [2].

ВИСНОВОК. Одержані результати однозначно свідчать про високу чутливість і селективність відповіді молекулярних детоксикаційних систем тканин двостулкового моллюска на дію несприятливих чинників у екологічно

© Л.Л. Гнатишина, Г.І. Фальфушинська, О.Б. Столяр, 2009.

Медичн хімія – т. 11, 4, 2009

Таблиця 1 – Специфічні біохімічні маркери беззубки ($M \pm \delta$, $n=8$)

Показник	Група	Травна залоза		Зябра	
		Весна	Літо	Весна	Літо
Металотіонеїни, мкг/мг білків	I	0,3±0,04	1,8±0,50	0,7±0,18	1,9±0,31
	B	0,4±0,08 ^a	1,0±0,21 ^a	0,5±0,08 ^a	2,9±0,71 ^a
	N	0,2±0,03 ^a	3,3±1,11	0,4±0,08 ^a	2,5±0,52
Ацетилхолінестераза, нмоль АТХ/хв·г тканини	I	65,9±8,5	143,5±55,2	38,8±9,2	43,9±6,2
	B	67,9±11,5	102,4±18,5	47,8±7,4 ^a	58,2±16,4
	N	74,9±6,4	159,3±19,6 ^b	39,6±7,4	49,2±14,3
Глутатіонтрансфераза, мкмоль GSH/хв·г тканини	I	4,3±0,4	4,6±0,2	2,5±0,2	2,5±0,1
	B	7,8±0,5 ^a	6,3±0,1 ^a	4,2±0,3 ^a	3,3±0,2 ^{a†}
	N	6,5±0,4 ^a	3,9±0,3 ^a	3,2±0,4 ^a	2,3±0,1
ЕРОД, пмоль/хв·г тканини	I	59,3±7,1	372,5±98,2	X	X
	B	58,1±1,9	492,5±126,4 [†]	X	X
	N	108,6±23,1 ^{a,b}	315,6±58,6 [↓]	X	X
Вітелогенінподібні білки, мкг P _n мл		Гемолімфа			
		Весна		Літо	
	I	217,8±49,6		506,2±73,0	
	B	203,0±12,7		765,3±83,5 ^a	
	N	440,8±9,9 ^{a,b}		839,1±246,3 ^{a†}	

Примітка. X – не визначалися; ^a – відмінність, порівняно з контролем, вірогідна; ^b – відмінність між групами B та N вірогідна, $p < 0,05$.

реальній концентрації, що дозволяє рекомендувати їх використання для раннього виявлення порушення біологічної безпеки в окремих регіонах.

Робота виконувалась за підтримки МОН України в межах міжнародних науково-технічних проектів № М/25-2009 та № М/13-2009.

ЛІТЕРАТУРА

1. Falfushynska H.I., Delahaut L., Stolyar O.B. et al. Multi-biomarkers approach in different organs of *Anodonta cygnea* from the Dnister basin (Ukraine) // Arch. Environ. Contam. Toxicol. – 2009. – 57, № 1. – P. 86-95.

2. Monserrat J.M., Martinez P.E., Geracitano L.A. et al. Pollution biomarkers in estuarine animals // Comp. Biochem. Physiol. – 2007. – 146C, № 2. – P. 221-234.

СПЕЦИФИЧЕСКИЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ МОЛЛЮСКОВ В ОЦЕНКЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ

Л.Л. Гнатишина, Г.И. Фальфушинская, О.Б. Столяр
ТЕРНОПОЛЬСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ВЛАДИМИРА ГНАТЮКА

Резюме

Оценивали чувствительность и селективность показателей активности этоксирезорифин О-деетилазы (ЭРОД), глутатион-S-трансферазы (GST), ацетилхолинэстеразы (АХЭ), содержания вителлогенинподобных белков и металлотіонеинов (MT) в тканях двустворчатого моллюска *Anodonta cygnea* из трех местностей в две поры года. Установили активацию ЭРОД и GST, угнетение АХЭ в аграрной местности и стойкие признаки феминизации у самцов моллюсков из пруда-охладителя АЭС. MT скорее были маркером оксидативного стресса, чем загрязнения тяжелыми металлами.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: двустворчатые моллюски, металлотіонеины, этоксирезорифин О-деетилаза, глутатион-S-трансфераза, ацетилхолинэстераза, вителлогенин.

SPECIFIC BIOCHEMICAL MARKERS OF MOLLUSCS IN THE ASSESSMENT OF BIOLOGICAL SAFETY

L.L. Hnatyshyna, H.I. Falfushynska, O.B. Stoliar

TERNOPII NATIONAL PEDAGOGICAL UNIVERSITY BY VOLODYMYR HNATIUK

Summary

*The sensitivity and selectivity of the indexes of ethoxyresorufin-O-diethylase (EROD), glutathione-S-transferase (GST), acetylcholinesterase (AChE) activity, the content of vitellogenin-similar proteins and metallothioneins (MT) in the tissues of bivalve mollusc *Anodonta cygnea* from three areas in two seasons were estimated. The activation of EROD, GST and the oppression of AChE in the agricultural area and the stable signs of feminization in the males-molluscs from the cooler pond of nuclear power station were determined. MT were rather the marker of oxidative stress than of the pollution by heavy metals.*

KEY WORDS: bivalve molluscs, metallothioneins, EROD, glutathione-S-transferase, acetylcholinesterase, vitellogenin-similar proteins.

Отримано 7.09.2009 р.

Адреса для листування: Л.Л. Гнатишина, Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка, вул. М. Кривоноса, 2, Тернопіль, 46027, Україна.

ВИВЧЕННЯ РАНОЗАГОЮВАЛЬНОЇ ДІЇ ОЛІЇ КІСТОЧОК ВИНОГРАДУ НА МОДЕЛІ ТРАФАРЕТНИХ РАН

А.Л. Загайко, Бакір Махер Назен, Н.В. Шишкіна, О.В. Файзуллін

НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ХАРКІВ

На моделі видавлених трафаретних ран у щурів встановлено, що олія кісточок винограду проявляє виразні репаративні властивості та прискорює процес загоєння ран. Місцеве застосування олії кісточок винограду на тлі ранового процесу зменшує виразність цитодеструктивних процесів, на що вказує зниження активності АлАТ та АсАТ у сироватці крові піддослідних тварин, а також зменшення вмісту сечовини. За виразністю лікувального ефекту досліджуваний засіб не поступається препарату порівняння олії обліпіхи.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **виноград, поліфеноли, репаративні засоби.**

ВСТУП. У комплексному лікуванні ран широко використовують засоби для місцевого застосування (мазі, гелі, аерозолі). Засоби для місцевого лікування ран, що присутні на сучасному українському ринку, не завжди відповідають вимогам безпеки та ефективності. Важливе значення для вітчизняного споживача медичних послуг мають також фармако-економічні показники. У зв'язку з цим, проблема пошуку нових ефективних вітчизняних препаратів для місцевого лікування пошкоджень шкіри різного походження залишається актуальною.

Створення лікарських препаратів на основі рослинної сировини є вельми перспективним напрямком. Метою наших досліджень стало вивчення ранозагоювальної дії олії кісточок винограду.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Ранозагоювальну дію олії кісточок винограду вивчали на моделі видавлених трафаретних ран шкіри [1].

Досліди було проведено на 24 білих нелінійних щурах-самцях масою 200-220 г. Тваринам на попередньо депільованій та обробленій 5 % спиртовим розчином йоду ділянці шкіри на спині білатерально до хребта нанесли рану за допомогою металевого скарифікатора-пробійника діаметром 0,8 см. Маніпуляції зі щурами проводили в умовах барбамілового наркозу.

Олію кісточок винограду та препарат порівняння олію обліпіхи починали наносити на поверхню рани через добу після травмуван-

ня шкіри та продовжували протягом усього експерименту (1 раз на добу).

Висновок про виразність репаративної дії досліджуваного засобу робили за швидкістю загоєння ран, яку розраховували за формулою:

$$V = \frac{(S_{\text{макс}} - S_{\text{доц}})}{S_{\text{доц}}},$$

де $S_{\text{макс}}$ – максимальна площа рани, мм²;
 $S_{\text{доц}}$ – площа рани в день вимірювання, мм².

Крім того, з метою оцінки виразності цитодеструктивних процесів визначали активність аланінамінотрансферази й аспартатамінотрансферази (АлАТ та АсАТ) [2], а також вміст сечовини [3] у сироватці крові піддослідних тварин.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. На 2-гу добу експерименту запальна реакція в прилеглих до рани тканинах усіх піддослідних тварин була виражена незначно: відзначалися набряклість та почервоніння країв рани, на її поверхні утворився струп.

Крім того, в щурів усіх дослідних груп мало місце зростання активності АлАТ та АсАТ, а також підвищення вмісту сечовини у сироватці крові на 5-ту добу експерименту (табл. 1).

Аналіз експериментальних даних, які відображені на рисунку 1, свідчить про те, що у тварин дослідних груп, яких лікували олією кісточок винограду та олією обліпіхи, процес загоєння ран відбувався значно швидше, ніж у щурів групи контрольної патології.

Нами встановлено, що вже на 9-ту добу експерименту середня площа ран у тварин, яких лікували олією кісточок винограду та

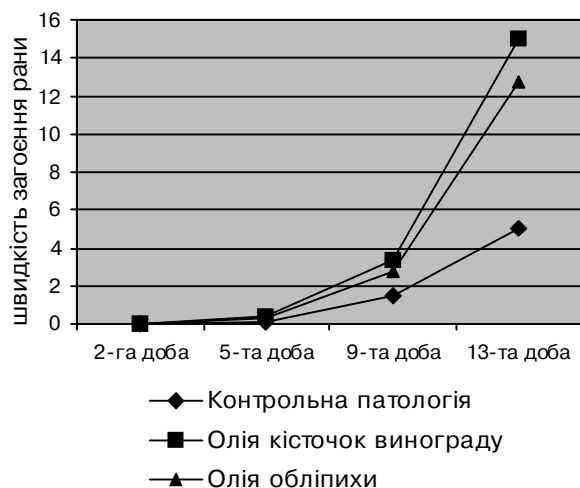


Рис. 1. Вплив олії кісточок винограду на швидкість загоєння трафаретних ран у щурів.

олією обліпихи, була статистично меншою за значення цього показника у щурів групи контрольної патології, при цьому швидкість за-

гоєння ран була у 2,28 та 1,92 раза більшою порівняно з контрольною групою.

На 13-ту добу швидкість загоєння ран у тварин, лікованих олією винограду та олією обліпихи, була, відповідно, у 2,97 та 2,52 раза більшою, ніж у тварин групи контрольної патології.

Повне загоєння ран у тварин, лікованих олією винограду та олією обліпихи, спостерігалося між 13-ю та 17-ю добами, тоді як у щурів групи контрольної патології – між 17-ю та 19-ю.

Дослідження біохімічних показників показало, що при застосуванні олії кісточок винограду та олії обліпихи достовірно (порівняно з контрольною патологією) знизилась активність АлАТ та АсАТ, а також вміст сечовини у сироватці крові піддослідних тварин на 9-ту добу експерименту, що свідчить про суттєве зменшення виразності цитодеструктивних процесів. З 13-ї доби дослідження відбувалася повна нормалізація активності маркерних ферментів у сироватці крові піддослідних тварин та рівня сечовини.

Таблиця 1 – Вплив олії кісточок винограду та олії обліпихи на динаміку деяких біохімічних показників на моделі видавлених трафаретних ран у щурів

Умови досліджу	Показник		
	АлАТ, ммоль/г-л	АсАТ, ммоль/г-л	Сечовина, мкмоль/л
Інтактний контроль	0,61±0,06	0,68±0,06	5,80±0,56
5-та доба дослідження			
Контрольна патологія	1,04±0,10*	1,08±0,15*	9,67±1,02*
Олія кісточок винограду	0,92±0,07*	0,93±0,13*	8,21±0,35**/**
Олія обліпихи	0,93±0,11*	0,95±0,11*	8,10±0,51**/**
9-та доба дослідження			
Контрольна патологія	0,88±0,09*	0,98±0,09*	9,28±0,86*
Олія кісточок винограду	0,73±0,10**/**	0,80±0,05**/**	7,48±0,54**/**
Олія обліпихи	0,75±0,09**/**	0,82±0,05**/**	7,43±0,65**/**
13-та доба дослідження			
Контрольна патологія	0,83±0,11*	0,77±0,08	7,82±0,56*
Олія кісточок винограду	0,67±0,08	0,75±0,06	6,33±0,69**
Олія обліпихи	0,65±0,09	0,75±0,10	6,62±0,57**

Примітка. * – розбіжність достовірна відносно інтактного контролю ($p \leq 0,05$); ** – розбіжність достовірна відносно контрольної патології ($p \leq 0,05$).

ВИСНОВКИ. Олія кісточок винограду проявляє виражену ранозагоєвальну дію на моделі видавлених трафаретних ран у щурів, прискорює процес загоєння ран та зменшує деструк-

цію тканин у вогнищі запалення. За виразністю ефекту досліджуваний засіб не поступається препарату порівняння олії обліпихи.

ЛІТЕРАТУРА

1. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Методичні рекомендації / За ред. О.В. Стефанова. – К.: Авіцена, 2001. – 528 с.
2. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: В 2 т. – Мн.: Беларусь, 2002. – 1. – 495 с.

3. Строев Е.А., Макарова В.Г. Практикум по биологической химии. – М.: Высшая школа, 1986. – С. 208-211.

ИЗУЧЕНИЕ РАНОЗАЖИВЛЯЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ МАСЛА КОСТОЧЕК ВИНОГРАДА НА МОДЕЛИ ТРАФАРЕТНЫХ РАН

А.Л. Загайко, Бакир Махер Назен, Н.В. Шишкина, А.В. Файзуллин
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ,
ХАРЬКОВ

Резюме

На модели выдавленных трафаретных ран у крыс установлено, что масло косточек винограда проявляет выраженные репаративные свойства и ускоряет процесс заживления ран. Местное применение масла косточек винограда на фоне раневого процесса уменьшает выраженность цитодеструктивных процессов, на что указывает снижение активности АлАТ и АсАТ в сыворотке крови подопытных животных, а также уменьшение содержания мочевины. По выраженности лечебного эффекта исследуемое средство не уступает препарату сравнения маслу облепихи.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **виноград, полифенолы, репаративные средства.**

STUDY OF WOUND-HEALING ACTION OF OIL FROM GRAPE SEEDS ON THE MODEL OF TRAPHARET WOUNDS

A.L. Zahayko, Bakir Maher Nazen, N.V. Shyshkina, O.V. Faisullin
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

Summary

On the trapharet wounds model at rats it has been shown that the oil from grape seeds shows the expressive reparative properties and accelerates the process of wound healing. The local application of oil from grape seeds against a background of wound process reduces the cytodestructive processes expressiveness, which is specified by decrease of aminotransferase activity in blood serum of experimental animals, and carbamide content reduction. The researched preparation does not concede to a preparation of comparison buckthorn oil by medical effect expressiveness.

KEY WORDS: **grape, polyphenols, reparative medications.**

Отримано 9.09.2009 р.

Адреса для листування: А.Л. Загайко, Національний фармацевтичний університет, вул. Мельникова, 12, Харків, 61002, Україна.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

ВПЛИВ КВЕРЦЕТИНУ ТА α -ТОКОФЕРОЛУ НА ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ ТИМОЦИТІВ ЩУРА ЗА УМОВ ІНГІБУВАННЯ ДИХАЛЬНОГО ЛАНЦЮГА МІТОХОНДРІЙ

Г.В. Петрова¹, Г.В. Донченко¹, О.В. Паршиков²
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМЕНІ О.В. ПАЛЛАДІНА НАН УКРАЇНИ¹, КИЇВ
ІНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГІЇ ТА ТОКСИКОЛОГІЇ АМН УКРАЇНИ², КИЇВ

Дія α -токоферолу й кверцетину в запобіганні індукованій мітохондріальними токсинами загибелі клітин не синергічна й не обмежується їх антиоксидантними властивостями.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: α -токоферол, кверцетин, дихальний ланцюг мітохондрій.

ВСТУП. Флавоноїд кверцетин є одним з основних компонентів *Crataegus oxyacantha*, *Leonurus cardiaca*, *Ginkgo biloba* й інших лікарських рослин, які використовують для лікування і профілактики різноманітних захворювань, у тому числі тих, що пов'язані з порушенням апоптозу. Мітохондрія є головною клітинною органелою, що забезпечує ініціацію та розвиток апоптозу. Серед можливих змін у мітохондріях, які визначають загибель клітини, основними є: втрата клітиною здатності синтезувати АТФ; вивільнення з мітохондрій проапоптичних факторів, які приводять до каскадної активації каспаз; оксидативне ушкодження мітохондрій як результат розвитку оксидативного стресу. Існують численні публікації щодо синергізму дії α -токоферолу й кверцетину, яку пов'язують в основному з антиоксидантними властивостями даних молекул [4]. Однак роль цих сполук в апоптозі, індукованому порушенням енергетичного обміну в мітохондріях, маловивчена. Мета роботи – порівняльне дослідження впливу α -токоферолу й кверцетину на виживаність тимоцитів щура при індукції загибелі клітин інгібіторами перенесення електронів у дихальному ланцюгу мітохондрій.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди проводили на білих щурах-самках масою 100-150 г відповідно до національних Загальних етичних принципів експериментів на тваринах. Одержання тимоцитів, підрахунок кількості клітин і визначення їх життєздатності за допомогою барвника трипанового синього проводили, як описано раніше [2]. Життєздатність свіжовиділених тимоцитів становила не менше 97 %. Концентрації досліджуваних речовин наведено на рисунках 1-3. Життєздатність

клітин у рутинних експериментах оцінювали з використанням 3-[4,5-диметилтіазол-2-іл]-2,5-дифеніл-тетразолій бромід (МТТ-тест), як описано раніше [1]. За 100 % брали кількість формазану, що утворився в аліквоті свіжовиділених інтактних тимоцитів.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. α -Токоферол, кверцетин і N-ацетил-L-цистеїн не впливали на життєздатність контрольних тимоцитів (дані не представлено). α -Токоферол повністю усував цитотоксичну дію олігоміцину, кверцетин же проявляв додатковий до олігоміцину ефект, знижуючи виживаність клітин більш ніж у 2 рази порівняно з олігоміцином (рис. 1). Олігоміцин інгібує мітохондріальну F1Fo-АТФазу за рахунок зв'язування з Fo-субодиноцею у складі ферментного комплексу. Кверцетин також здатен інгібувати F1Fo-АТФазу, причому ділянкою зв'язування для кверцетину є F1-субодиноця ферменту [5]. Імовірно, зв'язування олігоміцину й кверцетину з просторово розділеними субодиноцями ферментного комплексу приводить до синергічного ефекту в інгібуванні ферменту. Відзначимо, що кверцетин сам по собі не впливав на життєздатність контрольних тимоцитів, хоча є дані щодо його проапоптичної дії в культурі остеобластів [8]. Можливо, використаної нами концентрації кверцетину недостатньо для інгібування ним синтезу АТФ до того рівня, при якому запускається програма загибелі клітин. Однак на тлі зниження синтезу АТФ олігоміцином кверцетин проявляв додатковий ефект. Крім того, не виключена у даному випадку можливість прооксидантної дії кверцетину, оскільки він здатний проявляти як антиоксидантні, так і прооксидантні властивості [7].

Антибіотик антимицин А блокував перенесення електронів у дихальному ланцюгу міто-

© Г.В. Петрова, Г.В. Донченко, О.В. Паршиков, 2009.

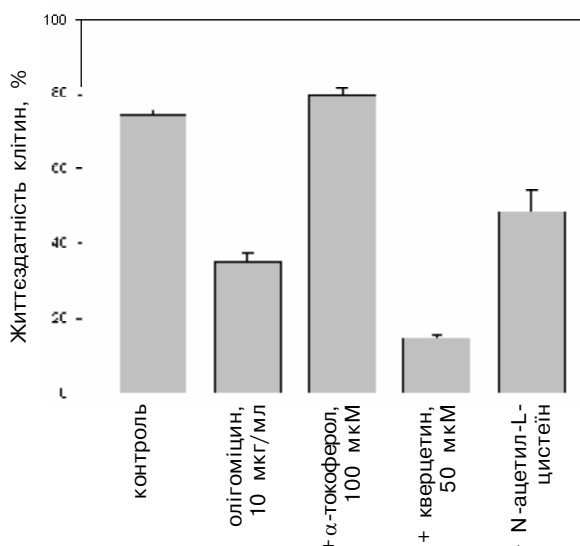


Рис. 1. Життєздатність тимоцитів щура за умов дії олігоміцину та при додаванні α -токоферолу, кверцетину та N-ацетил-L-цистеїну.

хондрій від убіхінону на цитохром с (комплекс III), що приводить до швидкого зниження синтезу АТФ. Як і у випадку з олігоміцином, α -токоферол ефективно запобігав загибелі тимоцитів, тоді як кверцетин проявляв додаткову до антиміцину А цитотоксичну дію (рис. 2).

Відзначимо, що індукція загибелі клітин антиміцином А й олігоміцином опосередковується більшою мірою саме зниженням рівня синтезу АТФ, а не розвитком оксидативного

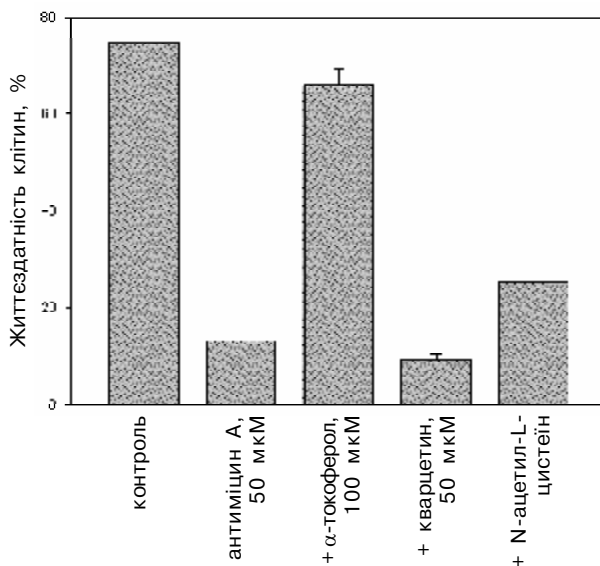


Рис. 2. Життєздатність тимоцитів щура за умов дії антиміцину А та при додаванні α -токоферолу, кверцетину та N-ацетил-L-цистеїну.

стресу [9]. Це вказує на те, що антиоксидантна дія не є основним і єдиним механізмом інгібування α -токоферолом загибелі клітин. Підтвердженням вищесказаного може бути той факт, що у наших експериментах N-ацетил-L-цистеїн – універсальний скавенджер активних

форм кисню і попередник синтезу глутатіону в клітині, проявляє набагато менш виражений цитопротекторний ефект, ніж α -токоферол (рис. 1 і 2). Крім того, при індукції апоптозу клітин ендометрія пероксидом водню виявлено позитивну дію на виживаність клітин кверцетину і N-ацетил-L-цистеїну, але не α -токоферолу [3]. Механізми неантиоксидантної дії α -токоферолу в даному випадку не відомі, але можна припустити запобігання α -токоферолом зв'язуванню олігоміцину з Fo-субодиницею АТФази, а також зміну ним фізико-хімічного стану мітохондріальної мембрани, що відновлює обертальну здатність зануреної в ліпідний шар Fo-субодиниці.

Інша картина спостерігалася при індукції загибелі тимоцитів інгібітором комплексу II дихального ланцюга мітохондрій – 3-нітропропіоновою кислотою (рис. 3). Її дія зумовлена необоротним інгібуванням сукцинатдегідрогенази мітохондрій, що супроводжувалося підвищенням продукування активних форм кисню і розвитком оксидативного стресу [6]. Кверцетин практично повністю відновлював життєздатність тимоцитів, виражений позитивний ефект проявляв також N-ацетил-L-цистеїн, тоді як цитопротекторна дія α -токоферолу була значно нижчою порівняно з такою на тлі дії олігоміцину й антиміцину А (рис. 3).

Відзначимо, що цитотоксичний ефект інгібіторів комплексів I і II дихального ланцюга мітохондрій більшою мірою опосередковується розвитком оксидативного стресу, тоді як блокатори комплексів III і IV (а також V – F1Fo-АТФази) викликають колапс мітохон-

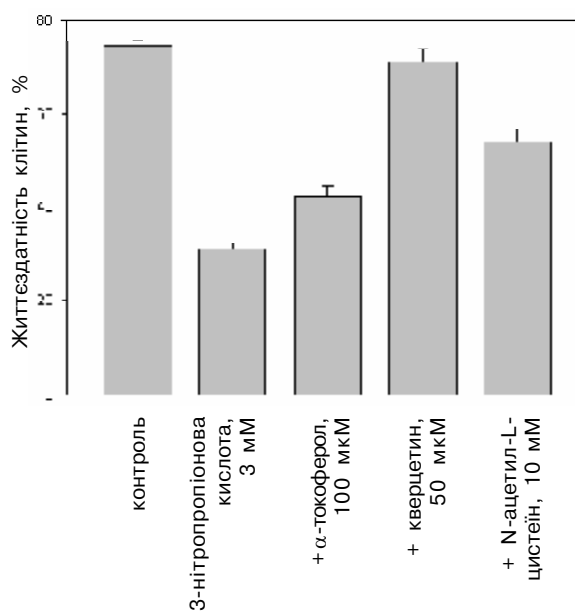


Рис. 3. Життєздатність тимоцитів щура за дії 3-нітропропіонової кислоти та при додаванні α -токоферолу, кверцетину та N-ацетил-L-цистеїну.

дріальної пори й зниження кількості внутрішньоклітинного АТФ без значного збільшення продукції активних форм кисню [9]. Імовірно, саме ця обставина зумовлює загальну потенційну можливість інгібування антиоксидантами цитотоксичності блокаторів комплексів I і II, але не III-V дихального ланцюга мітохондрій.

ВИСНОВКИ. 1. Кверцетин ефективно запобігав загибелі клітин, індукованій блокатором

комплексу II дихального ланцюга мітохондрій, однак проявляв додатковий цитотоксичний ефект до дії блокаторів комплексів III і V.

2. α -Токоферол, повністю усуваючи цитотоксичну дію блокаторів комплексів III і V, був значно менш ефективним стосовно інгібітора комплексу II.

3. Дія α -токоферолу й кверцетину не синергічна і не обмежується їх антиоксидантними властивостями.

ЛІТЕРАТУРА

1. Петрова Г.В., Донченко Г.В. Влияние α -токоферола и его производных на апоптоз тимоцитов крыс, индуцированный актиномицином D // Укр. біохім. журн. – 2005. – **77**, № 1. – С. 102-107.

2. Петрова Г.В., Капралов А.А., Донченко Г.В. Сравнительное исследование действия токоферола, его синтетического производного и ионола на индуцированный дексаметазоном апоптоз тимоцитов крыс // Укр. біохім. журн. – 2003. – **75**, № 1. – С. 78-84.

3. Estany S., Palacio J.R., Barnadas R. et al. Antioxidant activity of N-acetylcysteine, flavonoids and alpha-tocopherol on endometrial cells in culture // J. Reprod. Immunol. – 2007. – **75**, № 1. – P. 1-10.

4. Frank J. Beyond vitamin E supplementation: an alternative strategy to improve vitamin E status // J. Plant. Physiol. – 2005. – **162**, № 7. – P. 834-843.

5. Gledhill J.R., Montgomery M.G., Leslie A.G. et al. Mechanism of inhibition of bovine F1-ATPase by resveratrol and related polyphenols // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2007. – **104**, № 34. – P. 13632-13637.

6. Mandavilli B.S., Boldogh I., Van Houten B. 3-Nitropropionic acid-induced hydrogen peroxide, mitochondrial DNA damage, and cell death are attenuated by Bcl-2 overexpression in PC12 cells // Mol. Brain Res. – 2005. – **133**, № 2. – P. 215-223.

7. Robaszekiewicz A., Balcerczyk A., Bartosz G. Antioxidative and prooxidative effects of quercetin on A549 cells // Cell Biol. Int. – 2007. – **31**, № 10. – P. 1245-1250.

8. Son Y.O., Kook S.H., Choi K.C. et al. Quercetin accelerates TNF-alpha-induced apoptosis of MC3T3-E1 osteoblastic cells through caspase-dependent and JNK-mediated pathways // Eur. J. Pharmacol. – 2008. – **579**, № 1-3. – P. 26-33.

9. Zhang J.G., Tirmenstein M.A., Nicholls-Grzemski F.A. et al. Mitochondrial electron transport inhibitors cause lipid peroxidation-dependent and -independent cell death: protective role of antioxidants // Arch. Biochem. Biophys. – 2001. – **393**, № 1. – P. 87-96.

ВЛИЯНИЕ КВЕРЦЕТИНА И α -ТОКОФЕРОЛА НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ТИМОЦИТОВ КРЫСЫ ПРИ ИНГИБИРОВАНИИ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ МИТОХОНДРИЙ

Г.В. Петрова¹, Г.В. Донченко¹, А.В. Паршиков²
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ ИМЕНИ А.В. ПАЛЛАДИНА НАН УКРАИНЫ¹, КИЕВ
ИНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГИИ И ТОКСИКОЛОГИИ АМН УКРАИНЫ², КИЕВ

Резюме

Действие α -токоферола и кверцетина в предотвращении индуцированной митохондриальными токсинами гибели клеток не синергично и не ограничивается их антиоксидантными свойствами.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: α -токоферол, кверцетин, дыхательная цепь митохондрий.

INFLUENCE OF QUERCETIN AND α -TOCOPHEROL ON RAT THYMOCYTES SURVIVAL AT INHIBITION OF MITOCHONDRIAL RESPIRATORY CHAIN

H.V. Petrova¹, H.V. Donchenko¹, O.V. Parshykov²
INSTITUTE OF BIOCHEMISTRY BY O.V. PALLADIN OF NAS OF UKRAINE¹, KYIV
INSTITUTE OF PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY OF AMS OF UKRAINE², KYIV

Summary

Action of α -tocopherol and quercetin in prevention of mitochondrial toxin-induced cell death is not synergetic and it is not limited by their antioxidant properties.

KEY WORDS: α -tocopherol, quercetin, mitochondrial respiratory chain.

Отримано 15.01.2009 р.

Адреса для листування: Г.В. Петрова, вул. Братиславська, 14, кв. 134, Київ, 02156, Україна.

ВПЛИВ ВВЕДЕННЯ НІКОТИНОВОЇ КИСЛОТИ НА ПІРУВАТДЕГІДРОГЕНАЗНУ АКТИВНІСТЬ У ТКАНИНАХ ЩУРІВ ПІСЛЯ РЕНТГЕНІВСЬКОГО ОПРОМІНЕННЯ

О.О. Кокошкіна, О.В. Запорожченко

ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.І. МЕЧНИКОВА

Вивчення механізмів біокаталізу і можливості регуляції ферментативної активності в організмі як у нормі, так і при екстремальних станах є актуальним завданням сьогодення. Враховуючи важливу роль в метаболізмі кетокислот ферментів циклу трикарбонових кислот, ми досліджували вплив загального одноразового рентгенівського опромінювання (РО) і можливої захисної дії нікотинової кислоти (НК) на активність піруватдегідрогенази (ПДГ), яка зумовлює введення вуглеводів у цикл Кребса, в тканинах щурів.

1-ша група – контрольні тварини. Щури 2-ї групи внутрішньом'язово отримували НК в дозі 10 мг/кг маси. Тварини 3-ї групи підлягали РО в дозі 6 Гр. Щурам 4-ї групи внутрішньом'язово вводили НК в дозі 10 мг/кг маси, вони підлягали РО в дозі 6 Гр. В кожній групі було по 6 щурів. Через 30, 60, 120, 240 хв, 24 год, 3 та 15 діб тварин виводили з експерименту, використовуючи тіопенталовий наркоз. Активність ПДГ досліджували в крові, печінці, нирках, мозку і тонкій кишці щурів.

Відзначили зниження активності ПДГ в тонкій кишці й підвищення активності ферменту в інших тканинах у різний термін після введення НК. Опромінення викликало зниження активності ПДГ у крові, нирках, печінці й тонкій кишці щурів. Опромінення на фоні попереднього введення НК спричиняло підвищення активності ПДГ в ранні строки (1-ша доба). На 3-тю добу активність ПДГ у нирках, крові й мозку щурів цієї групи знижувалась, а в печінці й тонкій кишці зростала відносно опромінених тварин.

Отримані результати можуть бути передумовою для використання НК як засобу, який нормалізує дисферментози енергетичного обміну при різних екстремальних станах організму.

ОСОБЛИВОСТІ ПЕРЕБІГУ ХРОНІЧНОГО ПІЕЛОНЕФРИТУ НА ФОНІ ВІЛ-ІНФЕКЦІЇ

Р.В. Гуменюк, В.С. Гойдик, А.І. Гоженко

*УКРАЇНСЬКИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ІНСТИТУТ МЕДИЦИНИ ТРАНСПОРТУ
ОДЕСЬКИЙ ОБЛАСНИЙ ЦЕНТР ПО ПРОФІЛАКТИЦІ ТА БОРОТЬБІ ЗІ СНІДОМ*

Відомо, що у хворих на СНІД, особливо при переході захворювання в IV клінічну стадію, як правило, виявляють патологію внутрішніх органів. До найбільш частих захворювань, які ускладнюють перебіг СНІДу, відносять пієлонефрит. Однак хронічний пієлонефрит не завжди діагностують при житті, й досить часто не проводять адекватну терапію, що зумовлено особливостями клініки даного захворювання.

У зв'язку з цим, нами проведено клініко-лабораторне обстеження 100 хворих, які перебували на лікуванні в ООЦПБ зі СНІДом. Чіткі прояви хронічного пієлонефриту відзначено у 64 % хворих, у 36 % пацієнтів картина мала прихований характер.

Отримані дані показують, що у ВІЛ-інфікованих хворих із хронічним пієлонефритом зареєстровано: больовий та інтоксикаційний синдроми – у всіх пацієнтів, які перебували на лікуванні, лихоманку і субфебрилітет, які мали затяжний характер, – у 40 % хворих, симптом Пастернацького – у 27 %. Синдром артеріальної гіпертензії характерний для пацієнтів з IV клінічною стадією захворювання (12 % осіб). Дизуричний синдром спостерігався нами у більшості хворих з ВІЛ-інфекцією, особливо чітко він проявлявся при кількості CD4-лімфоцитів менше 200/мкл. Синдром анемії відмічено у 70 % хворих.

Сечовий синдром залежить від ступеня імунної недостатності. У 38 % хворих в загальному аналізі сечі виявлено лейкоцитів більше 10 в полі зору та гіалінові циліндри, у 72 % – лейкоцитурію до 10 в п/з. Еритроцитурія, характерна для IV клінічної стадії, мала місце у 21 % осіб (більше 3 в п/з). Протеїнурія чітко проявлялась при кількості CD4-лімфоцитів менше 200/мкл. У 32 % хворих – білок понад 0,099 г/л, у 23 % – білок в сечі більше 0,99 г/л. Зернисті циліндри виявлено у 52 % пацієнтів.

Таким чином, хронічний пієлонефрит є частим захворюванням, не завжди діагностованим при СНІДі, особливо III-IV клінічних стадій, зі стерними клініко-лабораторними показниками.

ВПЛИВ ТИРОЗИНАТУ ЦИНКУ ТА ЕНТЕРОСОРБЕНТУ “ФІБРАБЕТ” НА СТАН АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ У ЩУРІВ, УРАЖЕНИХ СОЛЯМИ КАДМІЮ ТА КОБАЛЬТУ

М.В. Чорна, Я.І. Гонський, І.Р. Бекус, Н.А. Васишин
ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО

Загальноновизнано, що промислові підприємства і транспорт сьогодні інтенсивно забруднюють навколишнє середовище. В атмосфері, природних водах і ґрунтах часто виявляють підвищені концентрації важких металів, зокрема кадмію та кобальту. Відомо, що іони цих металів спричиняють виникнення оксидативного стресу, що включає і зміни в роботі антиоксидантної системи. Використання металокомплексів амінокислот з метою корекції цих порушень є новим і перспективним напрямком. Тому метою нашої роботи було вивчення впливу тирозинату цинку й ентеросорбенту “Фібрабет” на активність супероксиддисмутази та концентрацію сечової кислоти у щурів з кадмій-кобальтовою інтоксикацією.

Експериментальні дослідження виконані на білих нелінійних щурах-самцях масою 180-200 г. Ураження викликали введенням тваринам $CdCl_2$ в дозі 7 мг/кг та $CoCl_2$ в дозі 5 мг/кг маси тіла тварини. Тирозинат цинку вводили в дозі 0,36 мг/кг маси тіла. Ентеросорбент “Фібрабет” тварини отримували протягом усього дослідження в дозі 1 г/кг. Тварин декапітували під тіопенталовим наркозом на 1-шу та 4-ту доби після інтоксикації. Визначали активність супероксиддисмутази (СОД) у гомогенаті печінки та концентрацію сечової кислоти у плазмі крові.

Проведені нами експерименти показали, що активність інактивованої СОД у гомогенаті печінки уражених щурів вірогідно зростала на 20 % через 24 год після ураження та корекції і на 29 % через 96 год. Застосування комбінації коригуючих чинників призвело до відновлення активності супероксиддисмутази, що підтвердилося її рівнем 99 % на 1-шу добу та 96 % на 4-ту добу від рівня інтактних тварин. Зафіксовано також більш значне зростання вмісту сечової кислоти при використанні комбінації тирозинату цинку та ентеросорбенту “Фібрабет”, ніж при застосуванні тільки металокомплексу, він був на 87 % вищим від такого в уражених щурів на 1-шу добу та на 70 % на 4-ту. Хоча концентрація цього неферментативного антиоксиданта значно підвищувалась, але її значення залишалось нижчим від рівня інтактних тварин як на 1-шу ($p_1 < 0,02$), так і на 4-ту ($p_1 < 0,001$) доби.

Таким чином, застосування тирозинату цинку в поєднанні з ентеросорбентом “Фібрабет” призвело до нормалізації активності супероксиддисмутази в гомогенаті печінки щурів з кадмій-кобальтовою інтоксикацією, а концентрація сечової кислоти в плазмі крові коригованих тварин не досягала рівня інтактних тварин, але в загальному спостерігалася тенденція до її нормалізації.

КОРЕКЦІЯ МЕЛАТОНІНОМ СУБЦИРКАДІАННИХ РИТМІВ ПОКАЗНИКІВ АКТИВНОСТІ ГЛУТАТІОНПЕРОКСИДАЗИ У НИРКАХ ЩУРІВ ПРИ ІНТОКСИКАЦІЇ ТЕТРАХЛОРМЕТАНОМ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО РІВНОДЕННЯ

І.В. Мацьопа
БУКОВИНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ЧЕРНІВЦІ

Усі функції організму підпорядковані своїм власним ритмам, а вони, у свою чергу, циркадіанним та білядобовим ритмам. Нирки займають вагоме місце в забезпеченні динамічної рівноваги внутрішнього середовища організму і також характеризуються часовою організацією функцій.

Після 7-денного моделювання світлових умов (12 світла:12 темряви, 1500 лк) тварин поділяли на групи: 1-ша – тваринам внутрішньошлунково вводили о 8.00 год фізіологічний розчин, який містив 0,046 % розчин спирту – еквівалентний у розчині мелатоніну (контроль); 2-га

– тваринам внутрішньошлунково щоденно в ранкові години двічі вводили 50 % розчин CCl_4 (0,25 мл/100 г маси тварини); 3-тя – тваринам, інтоксикованим CCl_4 , протягом 5-ти днів вводили розчин мелатоніну в дозі 3,0 мг/кг маси тварини. Евтаназію тварин здійснювали шляхом декапітації під легким ефірним наркозом о 8.00, 12.00, 16.00 та 20.00 год. У супернатантах 5 % гомогенатів нирок (на трис-НСІ буфері, рН 7,4) визначали активність глутатіонпероксидази (ГП).

При дослідженні білядобових ритмів активності ГП у нирках щурів виявлено, що за умов експериментального рівнодення у тварин групи контролю максимум активності припадав на 16.00 год ((138,3±10,84) нмоль/хв/мг білка), мінімум – на 12.00 год ((120,9±14,21) нмоль/хв/мг білка). Активність ГП при тетрахлорметановому ураженні зросла, порівняно з контролем, у середньому на 45 % з 8.00 до 20.00 год зі зміною ритму ферменту та зміщенням максимуму з 16.00 (контроль) на 12.00 год ((244,5±17,60) нмоль/хв/мг білка). Введення мелатоніну на фоні інтоксикації призвело до відновлення структури ритму і зниження активності даного ферменту в середньому на 25 % з 8.00 до 20.00 год.

При ураженні тварин гепатотропною отрутою за умов експериментального рівнодення спостерігали підвищення абсолютних значень активності ферменту порівняно з контролем та зміну структури ритму зі зміщенням максимуму з 16.00 на 12.00 год. Мелатонін відновив хроноритми і низив абсолютні значення активності ГП у нирках щурів.

ЗМІНИ У СИСТЕМІ ПРООКСИДАНТИ–АНТИОКСИДАНТИ ПІД ВПЛИВОМ АНТИРЕТРОВІРУСНИХ ЗАСОБІВ

К.А. Посохова, О.О. Шевчук

ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО

Показники захворюваності на ВІЛ/СНІД в Україні складають 176,2 на 100 тис. населення (2008). Високоактивна антиретровірусна терапія, яка за останні десятиліття дозволила збільшити тривалість та поліпшити якість життя пацієнтів з ВІЛ/СНІДом, характеризується значною кількістю побічних ефектів, у т.ч. гепатотоксичністю, що перешкоджають повноцінному лікуванню та іноді стають причиною його переривання.

Метою дослідження було з'ясування можливості попередження токсичної дії антиретровірусних препаратів (АРВ) – нуклеозидного інгібітора зворотної транскриптази ставудину (5 мг/кг) та нуклеозидного інгібітора ефавірензу (150 мг/кг) – шляхом призначення глутаргіну, ентеросгелю та їх комбінації. Дослідження проводили на білих нелінійних щурах-самцях: 1-ша група – здорові тварини, 2-га – тварини, які отримували зазначені антиретровірусні засоби протягом 28 днів, 3-тя, 4-та і 5-та групи – тварини які, крім антиретровірусних засобів, протягом останніх двох тижнів експерименту одержували глутаргін (45 мг/кг), ентеросгель (650 мг/кг) та їх поєднання відповідно. Біохімічні дослідження у гомогенатах печінки та сироватці крові щурів проводили наступного дня.

Встановлено, що під впливом АРВ рівень ТБК-активних продуктів (ТБП) у сироватці крові зростав на 23,3 %; у гомогенатах печінки вміст гідроперекисів ліпідів (ГПЛ) та ТБП збільшувалась на 21,3 та 49,9 % відповідно; активність супероксиддисмутази (СОД) і каталази знижувалась на 31,1 й 32,4 % у сироватці крові, у гомогенатах печінки – на 45,2 та 39,5 % відповідно у 2-й групі порівняно з 1-ю. У 3-й, 4-й та 5-й групах, порівняно з 2-ю, кількість ТБП зменшилась на 12,8; 21,9; 25,1 % (у сироватці крові); у гомогенатах печінки рівні ГПЛ знизились на 8,3; 11,6; 15,3 %, ТБП – на 9,6; 24,1; 27,9 % відповідно. Активність СОД і каталази в 3-й, 4-й та 5-й групах у сироватці крові зросла на 16,4; 28,4; 56,1 % і 27,0; 25,6; 37,1 % відповідно, у гомогенатах печінки – на 38,9; 27,6; 55,0 % та 16,8; 34,1; 52,5 % відповідно.

Таким чином, комбінація ставудину та ефавірензу при їх застосуванні протягом 28 днів призводить до активації перекисного окиснення ліпідів та зниження показників антиоксидантного захисту в крові та печінці експериментальних тварин. При корекції порушень, що виникають, ентеросгелем та глутаргіном зменшується інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів, відновлюється активність антиоксидантної системи. При поєднаному застосуванні глутаргіну та ентеросгелю відбувається нормалізація показників системи прооксиданти–антиоксиданти у крові та печінці.

БІОХІМІЧНІ ЗМІНИ В ОРГАНІЗМІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ТВАРИН ПРИ ТОКСИЧНОМУ ГЕПАТИТІ ЗА КОРЕКЦІЇ СОРБЕНТОМ ГСГД ТА МАГНІТОЛАЗЕРНИМ ВИПРОМІНЮВАННЯМ

Н.Є. Лісничук, І.Я. Демків, М.І. Куліцька, Л.П. Масловська
ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО

Ураження органів травної системи посідають важливе місце та є актуальною медико-біологічною проблемою сьогодення. Інтенсифікація та хімізація промисловості, сільського господарства і побуту дедалі більше впливають на структуру захворюваності. Тому мета даного дослідження – вивчення змін біохімічних показників крові білих щурів за умов токсичного ураження печінки та їх корекція за допомогою вуглецевого сорбенту IV покоління ГСГД і магнітолазерного випромінювання.

В експерименті використано 70 білих щурів-самців. Токсичний гепатит моделювали за Т.А. Короленко (1975). Для корекції використовували вуглецевий сорбент ГСГД (В.Г. Ніколаєв, 2007) та магнітолазерне випромінювання (МЛВ) (довжина хвилі – 635 нм, потужність – 150 мВт).

Концентрації загального білка, білірубину, холестерину й активності АлАТ та АсАТ визначали на біохімічному аналізаторі Humalyzer-2000. Активність каталази досліджували за методикою М.А. Королюка і співавт. (1988), супероксиддисмутази (СОД) – за С. Чеварі (1985), концентрацію церулоплазміну – за В.Г. Колб (1982).

Результати проведених досліджень вказують на те, що токсичне ураження печінки супроводжується суттєвими біохімічними змінами в організмі експериментальних тварин. Встановлено суттєве зростання активності АлАТ (у 2,6 раза), АсАТ (у 2,5 раза), каталази (на 44,3 %) та СОД (у 12,1 раза), концентрація загального білка підвищилась на 32,5 %, холестерину – в 6,03 раза, білірубину – в 3,1 раза та церулоплазміну – в 2,0 рази порівняно з показниками інтактних тварин.

При комбінованому застосуванні як корегувального чинника сорбенту ГСГД та МЛВ нами відмічено істотне зниження активності трансаміназ, а також концентрацій білірубину, загального білка, холестерину та церулоплазміну. Активності каталази і СОД (відповідно, в 1,4 та 1,5 раза) теж достовірно знижувались відносно аналогічних показників у групі тварин з некорегованим ураженням печінки.

Описана динаміка біохімічних показників свідчить на користь того, що застосування вуглецевого сорбенту ГСГД у поєднанні з низькоенергетичним МЛВ позитивно впливає на організм піддослідних тварин за умов його токсичного ураження.

НОВІ АСПЕКТИ ФІЗІОЛОГІЧНОЇ ДІЇ ПРОДУКТІВ ТРАНССУЛЬФУВАННЯ СІРКОВІСНИХ АМІНОКИСЛОТ

Н.О. Пентюк, Н.В. Заїчко, А.В. Мельник, І.І. Андрушко, О.І. Штатсько
*ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ М.І. ПИРОГОВА*

Інтерес до обміну сірковмісних амінокислот в останні роки різко посилюється у зв'язку із визнанням гіпергомоцистеїнемії незалежним фактором ризику ураження серцево-судинної системи, тромбозів, захворювань центральної нервової системи. Нещодавно також доведена патогенетична роль гіперцистеїнемії як самостійного фактора ризику розвитку патології судин. Крім того, сірковмісні амінокислоти є джерелом утворення біологічно активних молекул – гідроген сульфід (H₂S) та діоксиду сірки (SO₂), які залучені до регуляції судинного тону, нейромодуляції тощо. Не виключено, що механізми формування патологічних станів, обумовлених гіпергомоцистеїнемією та гіперцистеїнемією, можуть реалізуватись через порушення біосинтезу H₂S та SO₂. Нами встановлено, що H₂S має прямий вазодилатуючий ефект на судини в концентраціях 10⁻⁶ -10⁻² М. Найбільш чутливою до дії H₂S виявилась мезентеріальна артерія, дещо менше – ниркова артерія і найменшою мірою – аорта. Цистеїн також проявляє вазодилатуючу дію, яка нівелюється в присутності інгібіторів ферментів синтезу H₂S (зокрема, пропаргілгліцину). Ми встановили, що H₂S та цистеїн причетні до регуляції функції нирок: введення тваринам цистеїну та донора H₂S – Na₂S·9H₂O достовірно збільшує клубочкову фільтрацію та канальцеву реабсорбцію. Ще один аспект фізіологічної дії H₂S пов'язаний з регуляцією функціонального стану тромбоцитів та деяких білків системи згортання крові (антиагрегантний та антикоагулянтний ефект). Зменшення рівня H₂S в сироватці крові, індуковане гіпергомоцистеїнемією, асоціюється з вазоконстрикцією, порушенням фільтраційної функції нирок, посиленням агрегації тромбоцитів та активацією системи згортання крові, неврологічними розладами.