

О.О. Кравченко, Я.С. Максимович, О.В. Сокур, Л.І. Остапченко
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

ПОКАЗНИКИ ПРО- ТА АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ ЗА УМОВ РОЗВИТКУ КОЛІТАСОЦІЙОВАНОГО КАНЦЕРОГЕНЕЗУ І СТРЕСІНДУКОВАНОЇ ВИРАЗКИ ШЛУНКА ЩУРІВ

Наведено результати комплексного дослідження функціонування про- та антиоксидантної системи в клітинах різних органів щурів за умов розвитку стресіндукованої виразки шлунка та колітасоційованого канцерогенезу. Показано накопичення токсичних продуктів ліпопероксидації (ТБК-активних продуктів) на фоні зниження активності ключових ферментів антиоксидантної системи (супероксиддисмутази, каталази) за умов колітасоційованого канцерогенезу та зростання активності каталази при виразкоутворенні, що може бути додатковим патогенетичним фактором розвитку гострих запальних процесів та сприяти активації процесу загибелі клітин.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: стресіндукована виразка, колітасоційований канцерогенез, перекисне окиснення ліпідів, антиоксидантна система, ферменти.

ВСТУП. Згідно із сучасними уявленнями, багато фізіологічних і метаболічних процесів, що перебігають в організмі, тісно пов'язані з вільнорадикальним окиснюванням (ВРО) [10]. Процеси перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) мають велике значення для відновлення мембран, ротації їх білкового й ліпідного компонентів, регуляції фізико-хімічних властивостей клітин і субклітинних структур, відіграють важливу роль у підтримці транспорту електронів у дихальному ланцюзі, що лежить в основі окисних процесів у мітохондріях, регулюють сполучення дихання з окисним фосфорилуванням і є найпершою та найбільш мобільною ланкою в адаптації організму до екстремальних умов [17, 28]. У літературі є дані про те, що порушення ВРО є ранньою універсальною неспецифічною ланкою патогенезу багатьох захворювань [22]. Варто особливо підкреслити, що зміна ВРО передуює прояву клінічних симптомів захворювання. У разі надмірного накопичення продуктів ПОЛ в організмі розвивається синдром ліпідної пероксидації, що призводить до зміни структурно-функціональної організації мембран, інактивації ферментів, порушення клітинного поділу і фагоцитозу [1], зниження реактивності ендокринної та імунної систем [4, 13, 15, 26]. Сьогодні показано

роль ВРО у розвитку численних патологічних процесів: канцерогенезі, старінні, атеросклерозі, радіаційному ушкодженні, запаленні, ішемічних ушкодженнях, цукровому діабеті, нейродегенеративних хворобах, токсичних ушкодженнях тощо. Стаціонарний рівень ВРО й ПОЛ в організмі підтримується завдяки активності ферментативних і неферментативних антиоксидантних систем (АОС). Зниження активності АОС організму призводить до посилення активності ПОЛ і є неспецифічним маркером патологічних змін внутрішніх органів. Саме тому вивчення цих процесів з метою інтегральної оцінки стану організму людини при шкідливій дії хімічних і фізичних факторів усе ширше впроваджують у практику гігієнічних, біохімічних та біофізичних досліджень. Успішне вирішення даної проблеми дозволить розробити нові, ефективні методи ранньої діагностики, допоможе вести цілеспрямований, науково обґрунтований пошук оптимальних шляхів удосконалювання способів профілактики захворювань і підвищення резистентності організму. Такі перспективи надзвичайно актуальні відносно найпоширеніших захворювань людства, основне місце серед яких посідають запальні патології різних відділів шлунково-кишкового тракту, зокрема виразкова хвороба шлунка, гастрити, виразковий коліт (ВК) та їх ускладнення, найнесприятливішим серед яких є канцерогенез.

Метою роботи було вивчити функціонування системи антиоксидантного захисту і процесів ліпопероксидації за умов розвитку стрес-індукованої виразки шлунка та колітасоціюваного канцерогенезу.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. У роботі дотримувалися міжнародних рекомендацій про проведення медично-біологічних досліджень з використанням тварин відповідно до Європейської конвенції. Експериментальний колітасоціюваний канцерогенез у білих нелінійних щурів-самців з початковою масою 160-180 г викликали методом [18] за допомогою декстрансульфатнатрієвої солі (ДСН) і 1,2-диметилгідразину (ДМГ). Модель неспецифічного виразкового коліту товстої кишки створювали, повністю замінюючи питну воду на 1,5 % розчин декстрансульфатнатрієвої солі протягом 7 діб. Переродження індукували шляхом щотижневого підшкірного введення специфічного проканцерогену – 1,2-диметилгідразину протягом 2,5 місяців у дозі 20 мг/кг. Тварин після добового голодування декапітували через 1, 3 і 7 діб розвитку виразкового коліту і через 2, 4, 6, 8 і 10 тижнів дії канцерогену. Розвиток патологій діагностували гістологічно, за специфічними симптомами та макроскопічними змінами слизової оболонки товстої кишки. Ізольовані клітини слизової оболонки товстої кишки отримували за модифікованим нами методом Roediger та ін. [25].

Дослідження виразкової хвороби шлунка проводили на нелінійних білих щурах-самцях масою 180-200 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію з вільним доступом до води. Нейродистрофічні ураження шлунка одержували за моделлю іммобілізаційного стресу в модифікації С.Д. Гройсмана та Т.Г. Каревіної [6]. Вміст ТБК-активних продуктів, активність супероксиддисмутази (СОД) і каталази визначали загальноприйнятими методами [5, 9, 16]. Кількість білка визначали за методом Bradford [20]. Експериментальні дані обробляли загальноприйнятими методами варіаційної статистики [2].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Інтенсифікація окиснювальних процесів та посилення ліпопероксидації клітинних мембран сприяють зниженню резистентності слизової оболонки товстої кишки, підвищенню проникності судин, утворенню ерозій та виразок за умов розвитку запалення. Клінічні дослідження свідчать про те, що застосування антиоксидантів при ВК зменшує кількість мутацій і знижує ризик розвитку колоректальних неоплазій [19].

У результаті проведених нами досліджень були виявлені зміни основного показника рівня ліпопероксидації – вмісту ТБК-активних продуктів (табл. 1).

Встановлено, що за умов запалення цей показник зростав уже через 3 (на 24 %) та 7 діб (на 31 %). Отримані результати узгоджуються з даними літератури [14], які вказують на збільшення вмісту дієнових кон'югатів та малонового діальдегіду (МДА) в сироватці крові й еритроцитах хворих на ВК. Зазначимо, що в ці ж терміни (3, 7 доби) розвитку експериментальної моделі мали місце типові прояви запалення та гострі симптоми коліту, які супроводжувались лімфоцитарною інфільтрацією. Фагоцитоз, характерний для лімфоцитів, призводить до багаторазового збільшення вмісту АФК в імунних клітинах з одночасним зростанням поглинання кисню в 20 і більше разів. Фагоцитуюча клітина активується бактеріями (механічними часточками, лектинами), що супроводжується індукцією ферменту плазматичної мембрани – НАДФ*Н-оксидази з формуванням із вільного молекулярного кисню супероксиду (O_2^-). В подальшому з участю іонів заліза відбувається дисмутація O_2^- до перекису водню, а мієлопероксидаза нейтрофілів призводить до формування гіпохлориту. Хімічно високоактивні сполуки в ході "дихального вибуху" вивільнюються як у фагосоми, так і в середовище, що не лише інактивує бактеріальні клітини, а й ушкоджує самі фагоцити та нормальні навколишні клітини [3].

Очевидно, саме ці процеси відіграють не останню роль у формуванні продуктів пероксидації, що виявлено під час розвитку коліту. Як було показано нами раніше, в ті ж строки відбуваються значне зменшення основних ліпідів мембран та накопичення вільних жирних кислот, які є найкращими субстратами для окиснення і при цьому утворюють ТБК-активні продукти [12].

Таким чином, зафіксоване накопичення продуктів ПОЛ під час розвитку коліту узгоджується з даними інших авторів [21] і є запальною реакцією, зумовленою не лише розладами системи антиоксидантного захисту, а й активацією фізіологічних імунних процесів. Дослідження вмісту ТБК-активних продуктів за умов дії канцерогену на фоні запалення показало, що через 2 тижні впливу ДМГ цей показник досягав свого максимального значення протягом експерименту і становив 204 % порівняно з контролем. На більш пізніх етапах розвитку колоректальної метаплазії статистично достовірних змін вмісту ТБК-активних продуктів виявити не вдалося. Зниження рівня ТБК-активних продуктів ПОЛ у клітинах слизо-

Таблиця 1 – Вміст ТБК-активних продуктів у слизових оболонках товстої кишки і шлунка при колітасоційованому канцерогенезі та виразковій хворобі

Часовий інтервал	ТБК-активні продукти, нмоль/мг білка
Колітасоційований канцерогенез	
контроль	185,89±15,26
3 доба ДСН-стимульованого коліту	230,77±19,64*
7 доба ДСН-стимульованого коліту	243,59±21,35*
ДСН+2 тижні ДМГ	378,21±35,08*
ДСН+4 тижні ДМГ	173,08±18,73
ДСН+6 тижнів ДМГ	179,49±17,12
ДСН+8 тижнів ДМГ	217,95±20,83
ДСН+10 тижнів ДМГ	218,06±21,04
Стрессова виразка шлунка	
контроль	95,67±8,07
1 год дії стресу	185,45±15,45*
2 год дії стресу	215,57±17,88*
3 год дії стресу	287,01±22,45*

Примітка. * – $p \leq 0,05$ відносно контролю, $M \pm m$; $n=8$.

вої оболонки товстої кишки може бути викликаним зменшенням вмісту ліпідів, які є субстратом ПОЛ. Надмірна акумуляція продуктів ПОЛ на перших тижнях дії канцерогену, очевидно, не є імунною відповіддю на запальний чинник і супроводжується вираженими цитотоксичними та мутагенними реакціями.

Сьогодні численні дослідження показують залучення ПОЛ до патологічних механізмів формування уражень слизової оболонки шлунка. Існує ряд робіт, в яких продемонстровано активацію перекисного окиснення ліпідів у покривно-епітеліальному шарі слизової оболонки шлунка. Вважають, що це є поліетіологічним процесом, залежним від зовнішніх і внутрішніх факторів, таких, як гострі та хронічні стресові ситуації, імунологічні конфлікти, продукти катаболізму й анаболізму і багато інших. Вплив шкідливих факторів на слизову оболонку шлунка призводить до розвитку патологічних змін: запальних процесів, геморагічних ерозій і, зрештою, гострих виразок. Причиною цих змін є деструкція бар'єру слизової оболонки та подальший розлад захисних внутрішньоклітинних механізмів [7]. Стрессогенні ураження слизової оболонки шлунка розвиваються на фоні порушення мікроциркуляції, морфологічно проявляються змінами стінок кровоносних капілярів і супроводжуються значним ушкодженням секреторних клітин залозистого апарату та інших структур [24]. Гострий стрес супроводжується також комплексом біохімічних змін, зокрема окисно-відновних процесів, перш за все підвищенням інтенсивності процесів вільнорадикального окиснення ліпідів. Цей факт можна пояснити зниженням функціональних можли-

востей АОС, посиленням антиокисних властивостей глюкокортикоїдів та катехоламінів.

Проведені нами дослідження дали можливість встановити зростання вмісту ТБК-активних продуктів за умов експериментальної стресової виразки у 2,25 раза на 2 год і в 3 рази – на 3 (див. табл. 1).

Раніше було показано активацію процесів вільнорадикального окиснення в гомогенаті клітин слизової оболонки за умов формування виразок різного походження [8]. Подібні результати отримано в роботах інших авторів. Так, встановлено залучення активних форм кисню до формування уражень слизової оболонки шлунка, що зумовлені окисативним стресом [27], етанолом, нестероїдними проти-запальними препаратами [23]. Показано, що МДА є сильним мутагеном та має виражену цитотоксичну активність. Передбачають, що АФК ушкоджують хроматин, ДНК, мембрани, порушують регуляцію вмісту внутрішньоклітинного кальцію і т. ін. Є дані, що при стимуляції пухлин печінки індукторами одного з основних антиоксидантних ферментів цього органа – цитохрому Р-450 спостерігається механізм двофакторної дії: мітогенний ефект та інгібування міжклітинної комунікації. Поруч із цим високі концентрації АФК і ліпідних гідропероксидів (попередників МДА) пригнічують синтез ДНК, поділ клітин та мають здатність активувати апоптоз [11, 22, 28].

Показником ступеня посилення вільнорадикальних процесів є не тільки підвищення вмісту продуктів ПОЛ, а й характер функціонування систем антиоксидантного захисту. Вважають, що ступінь ПОЛ залежить від співвідношення ферментативних та неферментативних

антиоксидантних систем, які регулюють рівень продуктів ПОЛ. Важливим фактором, який визначає концентрацію вільних радикалів у клітинах слизової оболонки гастродуоденальної зони, є кооперативна робота ферментів СОД і каталази.

Вивчення особливостей антиоксидантного стану клітин різних органів та зіставлення

його зі встановленими нами змінами вмісту продуктів ПОЛ є актуальним питанням, вирішення якого може слугувати основою для пошуку шляхів пригнічення патологічних процесів.

Проведені нами дослідження активності СОД і каталази показали статистично достовірне зниження цих показників у всі терміни розвитку колітасоційованого канцерогенезу (табл. 2).

Таблиця 2 – **Супероксиддисмутазна і каталазна активність в епітеліальних клітинах слизової оболонки товстої кишки щурів при колітасоційованому канцерогенезі**

Часовий інтервал	СОД, ум.од./хв·мг білка	Каталаза, мкмоль H ₂ O ₂ /хв·мг білка
контроль	0,054±0,005	4,40±0,38
3 доба ДСН-стимульованого коліту	0,038±0,003*	3,48±0,33*
7 доба ДСН-стимульованого коліту	0,026±0,002*	3,32±0,29*
ДСН+2 тижні ДМГ	0,021±0,002*	3,21±0,31*
ДСН+4 тижні ДМГ	0,018±0,001*	3,28±0,42*
ДСН+6 тижнів ДМГ	0,025±0,003*	1,53±0,13*
ДСН+8 тижнів ДМГ	0,015±0,002*	2,75±0,25*
ДСН+10 тижнів ДМГ	0,017±0,002*	3,30±0,31*

Примітка. * – p≤0,05 відносно контролю.

Так, уже на початкових етапах впливу ДСН (3-тя доба) активність СОД складала лише 70 %, а каталази – 79 % від контролю, через 7 діб розвитку коліту дані показники продовжували знижуватись і становили, відповідно, 48 та 75 % від контролю. Припинення дії запального чинника – ДСН і застосування специфічного канцерогену супроводжувались подальшим зменшенням досліджуваних параметрів. Мінімальне значення активності каталази (35 % від контролю) було зафіксовано через 6 тижнів дії ДМГ, потім спостерігалось зростання цього показника, на 10-й тиждень експерименту він складав 75 % від контролю. Активність СОД за умов розвитку онкопатології знижувалась постійно, досягаючи найменших значень через 8 і 10 тижнів дії ДМГ (28 та 31 % від контролю відповідно). Отримані нами результати свідчать про швидке виснаження системи антиоксидантного захисту при розвитку запалення, дисплазії та злоякісної трансформації клітин. Ці процеси, як показано раніше, супроводжуються накопиченням продуктів ПОЛ. Інтенсифікація ПОЛ, у свою чергу, змінює склад та фізичний стан клітинних мембран, їх структурну організацію, чутливість до зовнішніх сигналів і функціональну активність клітини [22, 28].

При вивченні функціонування системи антиоксидантного захисту за умов розвитку стресової виразки нами також було встановлено зниження активності СОД на 19, 25 та 34,6 % відповідно в кожен з моментів спостережен-

ня (табл. 3). Активність каталази при цьому постійно зростала, досягаючи максимуму (150 % від контролю) на 3 год дії стресу. Можна припустити, що за таких умов накопичення H₂O₂ – субстрату каталази – відбувалось не внаслідок дії СОД, а за рахунок спонтанної дисмутації супероксидного аніона. Отримані результати свідчать про те, що при розвитку стресіндукованої експериментальної виразки шлунка знижувалась здатність супероксиддисмутази нівелювати супероксиданіон, відбувалось його надлишкове накопичення, що супроводжувалось збільшенням кількості продуктів пероксидації.

За умов накопичення в клітині пероксид водню при взаємодії з супероксидним аніоном може утворювати гідроксил-радикал, який є досить потужним окисником і основним фактором окисної модифікації клітинних структур, що викликає значні uszkodження молекул ДНК і мутації, які можуть призводити до патологій та загибелі клітин або їх злоякісного переродження [11].

Експериментальними і клінічними дослідженнями показано, що інтенсифікація процесів ПОЛ на фоні депресії системи антиоксидантного захисту підтримує локальний патологічний процес, сприяє порушенню мікроциркуляції та процесів обміну в тканинах ураженого органа, що, зрештою, може призвести до деградації тканин. Встановлені нами факти узгоджуються з раніше отриманими даними щодо зниження активності антиоксидан-

Таблиця 3 – Супероксиддисмутазна і каталазна активність у клітинах шлунка щурів за умов формування стресової виразки

Часовий інтервал	СОД, ум.од./хв·мг білка	Каталаза, мкмоль Н ₂ О ₂ /хв·мг білка
контроль	0,185±0,016	4,92±0,43
1 год дії стресу	0,15±0,014	6,02±0,59
2 год дії стресу	0,139±0,012	6,87±0,61
3 год дії стресу	0,121±0,011	7,38±0,69

Примітка. * – $p \leq 0,05$ порівняно з контролем.

тних ферментів за умов розвитку виразок шлунка іншого генезу [8]. Оцінка активності процесів ПОЛ та ступеня зсуву рівноваги між прооксидантами й антиоксидантами може бути чутливим показником загального стану організму, активності й функціонування систем підтримки гомеостазу [4]. Ці дані можуть містити інформацію про ступінь і глибину виразки дії деструктивного фактора на організм. Тому оцінку стану цього процесу можна включити до переліку методів моніторингу здоров'я, в тому числі й при проведенні лікувально-профілактичних заходів.

ВИСНОВКИ. 1. Отримані дані свідчать про те, що в патогенез як колітасоційованого кан-

церогенезу, так і стресіндукованої виразки шлунка залучені процеси вільнорадикального окиснення.

2. Показано, що розвиток стресових уражень слизової оболонки шлунка та колітасоційованого канцерогенезу супроводжується зростанням вмісту токсичних продуктів перекисного окиснення ліпідів (ТБК-активних продуктів) на всіх етапах спостереження.

3. Встановлено зниження активності основних ферментів антиоксидантного захисту (супероксиддисмутази і каталази) за умов розвитку колітасоційованого канцерогенезу і зростання активності каталази при стресіндукованих ураженнях слизової оболонки шлунка щурів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Барабой В.А. Перекисное окисление и радиация / В.А. Барабой, В.Э. Орёл, И.М. Карнаух. – К.: Наукова думка, 1991. – С. 23-178.
2. Брандт З. Статистические методы анализа наблюдений / З. Брандт. – М.: Мир, 1975. – 312 с.
3. Владимиров М.В. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / М.В. Владимиров, А.И. Арчаков. – М.: Наука, 1972. – С. 44-78.
4. Воейков В.Л. Регуляторные функции активных форм кислорода в крови и в водных модельных системах : автореф. дисс. на соискание науч. степени канд. биол. наук / В.Л. Воейков. – М., 2003.
5. Гаврилов В.П. Методика определения малонового диальдегида в сыворотке крови / В.П. Гаврилов, А.Р. Гаврилова, И.Г. Майорова // Вопр. мед. химии. – 1987. – № 1. – С. 118-122.
6. Гройсман С.Д. О влиянии атропина на стрессорные поражения слизистой оболочки желудка у крыс / С.Д. Гройсман, Т.Г. Каревина. – 1979. – 131 с. – Библ. указ. ВИНТИ. Деп. Рукописи. № 12. Б/о.
7. Избранные лекции по внутренним болезням. Часть 8: Язвенная болезнь / под ред. А. Разднова // МЕВ. – 2002. – № 106.
8. Ковальова В.А. Вплив пероксидації ліпідів на стан мембран клітин слизової оболонки шлунка щурів за умов експериментальної виразки: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук / В.А. Ковальова. – К., 2005. – 20 с.
9. Королюк М.А. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16-19.
10. Кулинский В.И. Активные формы кислорода и окислительная модификация макромолекул / В.И. Кулинский // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – № 1. – С. 2-7.
11. Лю Б.Н. Кислородно-перекисная концепция апоптоза и возможные варианты его механизма / Б.Н. Лю // Успехи современной биологии. – 2001. – **121**, № 5. – С. 488-501.
12. Мазо В.К. Глутатион, как компонент антиоксидантной системы желудочно-кишечного тракта / В.К. Мазо // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 1998. – № 1. – С. 47-53.
13. Октябрьский О.Н. Редокс-регуляция клеточных функций / О.Н. Октябрьский // Биохимия. – 2007. – **72**, № 2. – С. 158-174.
14. Сергієнко О.І. Патогенетичні аспекти профілактики порушень окислювально-антиокислювального гомеостазу у хворих на неспецифічний виразковий коліт / О.І. Сергієнко // Вестник гигиены и эпидемиологии. – 2004. – **8**, № 1. – С. 126-132.
15. Скулачев В.П. Кислород в живой клетке: Добро и зло / В.П. Скулачев // Соросовский образовательный журнал. – 1996. – № 3. – С. 4-10.
16. Чевари С. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения её в биологических материалах / С. Чевари, И. Чаба, И. Секей // Лаб. дело. – 1985. – № 11. – С. 578-681.
17. Adli M. The role of lipid peroxidation and product in cell signaling. / Adli M. – Sabanci Univ, 2002. – 210 p.
18. A novel mouse model for colitis-associated colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine and

dextran sulfate sodium / Jian-Guo Wang, Dong-Fei Wang, Bing-Jian Lov [et al.] // World J. Gastroenterol. – 2004. – **10**, № 20. – P. 2958-2962.

19. Beno I. Ulcerative colitis: activity of antioxidant enzymes of the colonic mucosa / I. Beno, M. Staruchova, K. Volkovova // Presse Med. – 1997. – **126**, № 31. – P. 1474-1477.

20. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for quantities of utilizing the principle of protein binding / M.M. Bradford // Analytical Biochemistry. – 1976. – **86**. – P. 193-200.

21. Experimental ulcerative colitis impairs antioxidant defense system in rat intestine / N. Nieto, M.I. Torres, M.I. Fernandez [et al.] // Dig. Dis. Sci. – 2000. – **45**, № 9. – P. 1820-1827.

22. Gamaley I.A. Roles of reactive oxygen species: signaling and regulation of cellular function / I.A. Gamaley, I.V. Klyubin // Int. Rev. Cytol. – 1999. – **188**. – P. 203-255.

23. Goksel S. Protective effect of increasing doses of famotidine, omeprazole, lansoprazole, and melatonin against ethanol-induced gastric damage in rats /

S. Goksel, K. Pasraloglu, G. Ayanoglu-dulger // Indian Journal. Pharmacol. – 2004. – **36** (3). – P. 171-174.

24. Oxidative stress and antioxidants status in peptic ulcer and gastric carcinoma / R. Tandon, H.D. Khanna, M. Dorababu, R.K. Goel // Indian J. Physiol. Pharmacol. – 2004. – **48**, № 1. – P. 115-118.

25. Roediger W.E.W. Methods of preparing isolated colonic epithelial cells (colonocytes) for metabolic studies / W.E.W. Roediger, S.C. Truelove // Gut. – 1979. – **20**. – P. 484-488.

26. Thannickal V.J. Reactive oxygen species in cell signaling / V.J. Thannickal, B.L. Fanburg // Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. – 2000. – **279**, № 6. – P. 1005-1028.

27. The role of reactive oxygen species in action of nitric oxide-donors on stress-induced gastric mucosal lesions / O.S. Kwiecie T. Brzozowski, P.Ch. Konturek [et al.] // J. Physiol. Pharmacol. – 2002. – **53**. – P. 761-773.

28. Wulf D. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function / D. Wulf // Physiol. Rev. – 2002. – **82**. – P. 47-95.

О.А. Кравченко, Я.С. Максимович, О.В. Сокур, Л.И. Остапченко
КИЕВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ТАРАСА ШЕВЧЕНКО

ПОКАЗАТЕЛИ ПРО- И АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ В УСЛОВИЯХ РАЗВИТИЯ КОЛИТАССОЦИИРОВАННОГО КАНЦЕРОГЕНЕЗА И СТРЕССИНДУЦИРОВАННОЙ ЯЗВЫ ЖЕЛУДКА КРЫС

Резюме

Представлены результаты комплексного исследования функционирования про- и антиоксидантной системы в клетках разных органов крыс в условиях развития стрессиндуцированной язвы желудка и колитассоциированного канцерогенеза. Показано накопление токсических продуктов липопероксидации (ТБК-активных продуктов) на фоне снижения активности ключевых ферментов антиоксидантной системы (супероксиддисмутаза, каталаза) в условиях колитассоциированного канцерогенеза и возрастания активности каталазы при язвообразовании, что может быть дополнительным патогенетическим фактором развития острых воспалительных процессов и способствовать активации процесса гибели клеток.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: стрессиндуцированная язва, колитассоциированный канцерогенез, перекисное окисление липидов, антиоксидантная система, ферменты.

O.O. Kravchenko, Ya.S. Maksymovych, O.V. Sokur, L.I. Ostapchenko
TARAS SHEVCHENKO KYIV NATIONAL UNIVERSITY

PARAMETERS OF PRO- AND ANTIOXIDANT SYSTEM UNDER DEVELOPMENT OF COLITIS-ASSOCIATED CARCINOGENESIS AND STRESS-INDUCED GASTRIC ULCER

Summary

Results of complex investigation of pro- and antioxidant system functioning in cells of different rat organs under development of colitis-associated carcinogenesis and stress-induced gastric ulcer were represented. It was shown that accumulation of toxic products of lipid peroxidation (TBA reactive substances) was accompanied with decrease of activities of the most important antioxidant enzymes (SOD and catalase) under development of colitis-associated carcinogenesis and increase of catalase activity under ulceration. Such changes are possible additional pathogenetic factor of acute inflammation development and promote cell death.

KEY WORDS: stress-induced ulceration, colitis-associated carcinogenesis, lipid peroxidation, antioxidant system, enzymes.

Отримано 12.10.10

Адреса для листування: О.О. Кравченко, вул. Наб.-Корчуватська, 96, кв. 59, Київ, 03045, Україна.

Медицина хімія – т. 12, № 4, 2010

КОМПОЗИЦІЇ ГЛЮКОЗАМІНУ ГІДРОХЛОРИДУ З ГЛЮКОЗАМІНУ АЦЕТИЛСАЛІЦИЛАТОМ ТА ЇХ ВПЛИВ НА МЕТАБОЛІЗМ КОЛАГЕНУ

У статті наведено результати біохімічного дослідження змін метаболізму та накопичення колагену в експериментальних тварин із моделлю кортикостероїдної дистрофії сполучної тканини під впливом лікування композиціями глюкозаміну гідрохлориду з глюкозаміну ацетилсаліцилатом у співвідношеннях 2:1; 1:1 та 1:2 за масою у дозі 100 мг/кг.

Відзначено, що у співвідношеннях 2:1 та 1:1 вказані композиції виявляли виражений стимулювальний ефект на біосинтез колагену з одночасним зниженням його катаболізму. Композиція зі співвідношенням даних компонентів 1:2 була значно менш активною.

На основі результатів досліджень як базову для створення нового протиаартрозного препарату рекомендовано композицію глюкозаміну гідрохлориду з глюкозаміну ацетилсаліцилатом у співвідношенні 1:1 за масою.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: хрящ, кров, колаген, біохімія, експеримент, остеоартроз, глюкозаміну гідрохлорид, кислота ацетилсаліцилова.

ВСТУП. Однією з найбільш актуальних проблем сучасної фармакології є розробка нових дієвих лікарських засобів для корекції дегенеративно-дистрофічних захворювань сполучної тканини, в тому числі опорно-рухового апарату [1].

Суглобовий хрящ оптимізований для витримки фізичних навантажень. Хондроцити є єдиними клітинами, представленими в зрілому суглобовому хрящі. Вони відповідальні за синтез макромолекул і цілісність міжклітинного матриксу. Змінні навантаження стимулюють хондроцити для підтримання метаболізму здорового хряща з необхідним білковим складом клітини згідно з прикладеним навантаженням. Навпаки, невідповідні навантаження змінюють склад хрящової тканини, призводячи до остеоартрозу [10].

Порівняно із зразками хряща з різним чином навантажених ділянок суглоба у здорових людей було виявлено більше співвідношення агрекан/колаген типу II ($p=0,057$) у зразках з більш навантажених ділянок. Порівняно з нормальним хрящем в остеоартрозу мало місце в 10-20 разів нижче співвідношення агрекан/колаген типу II. Це свідчить про те, що баланс між основними структурними

білками хряща є критичним для цілісності й функції тканини [8].

Молекули агрекану і колагену типу II спільно забезпечують цілісність хряща і його функціональність. Агрекан забезпечує гідратацію колагенової сітки і формує стійкість до стиснення та еластичність хрящової тканини. Разом із тим, колагенова сітка додає просторову організованість і стійкість молекулам протеогліканів. Недавно стало зрозуміло, що агрекан відіграє протекторну роль у запобіганні деградації колагенових фібрил. Пошкодження суглобового хряща, що призводять до деградації таких макромолекул хрящової тканини, як агрекан, колаген типу II, опосередковані через агреканизи і матриксні металопротеази [7].

Загибель хондроцитів, що індукується механічними пошкодженнями, знижували шляхом використання антиоксидантів [4].

Глюкозамін з успіхом застосовує велика кількість пацієнтів з остеоартрозом. Високі концентрації глюкозаміну мають анаболічні й протизапальні ефекти на хондроцити [6].

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Кортикостероїдну дистрофію в експериментальних білих щурів-самців лінії Вістар 3-місячного віку моделювали за методом R.G. Gray, N.L. Gottlieb [5] шля-

хом внутрішньом'язового введення 200 мг/кг гідрокортизону ацетату протягом 14-ти діб. 24 тварини були випадковим чином поділені на 4 групи по 6 щурів у кожній. Досліджувані субстанції і комбінації вводили експериментальним тваринам внутрішньошлунково у вигляді водного розчину або суспензії без стабілізатора раз на добу протягом 21-ї доби. До 1-ї групи (контроль патології) ввійшли щури, які замість лікування отримували 0,5 мл фізіологічного розчину на добу, тварин 2-ї групи лікували композицією глюкозаміну гідрохлориду з глюкозаміну ацетилсаліцилатом (1:2 за масою) в дозі 100 мг/кг, 3-ї – композицією (1:1 за масою) в тій же дозі, 4-ї – композицією (2:1 за масою) в тій же дозі. Водночас використовували групу інтактних тварин, що також складалася із 6 щурів. Після досліду тварин виводили з експерименту шляхом декапітації під ефірним наркозом. Для біохімічних досліджень у них було забрано кров і хрящове покриття з голівок кульшових, колінних та плечових суглобів.

У суглобовому хрящі визначали вміст гідроксипроліну [9], в сироватці крові – фракційний склад гідроксипроліну з поділом на фракції вільного, пептиднозв'язаного та білковозв'язаного гідроксипроліну [3].

Додатково вираховували відношення вмісту загального гідроксипроліну в суглобовому хрящі до його вмісту в сироватці крові, що відображає особливості накопичення та біосинтезу колагену, а також відношення вмісту білковозв'язаної фракції гідроксипроліну до вмісту його вільної фракції у сироватці крові, що показує переважання біосинтетичних або дегенеративних процесів у обміні колагену, відповідно, при збільшенні або зменшенні значень.

Результати досліджень було статистично оброблено за допомогою пакета програм Microsoft Excel із використанням t-критерію Стьюдента з визначенням середніх арифметичних, стандартного відхилення і вірогідності ряду. Після цього результати рядів експериментальних груп порівнювали з даними інтактної та контрольної груп, а також між собою. Статистично достовірним вважали розходження при $p < 0,05$ і менше [2].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Результати досліджень показали, що введення щурам гідрокортизону ацетату призводило до розвитку в них вираженої дистрофії сполучної тканини із пригніченням біосинтезу колагену та його накопичення у хрящі, а також прискорення руйнування раніше синтезованого колагену, про що можуть свідчити підвищення вмісту

фракції вільного оксипроліну і зниження вмісту фракції білковозв'язаного оксипроліну в сироватці крові, різке зменшення відношення вмісту білковозв'язаної фракції гідроксипроліну до вмісту його вільної фракції у сироватці крові (табл. 1). Відношення вмісту загального гідроксипроліну в хрящі до його вмісту в сироватці крові у всіх досліджених групах щурів достовірно не відрізнялося від такого в контрольних та інтактних тварин.

Результати фракційного аналізу оксипроліну сироватки крові та його вмісту в хрящовій тканині щурів, пролікованих композицією глюкозаміну гідрохлориду з глюкозаміну ацетилсаліцилатом у співвідношенні 1:2 за масою, вказують на те, що швидкість біосинтезу колагену в цих щурів була більшою, ніж у нелікованих тварин, що підтверджувалось на 32,82 % вищим рівнем фракції білковозв'язаного оксипроліну, який, однак, залишався на 20,27 % нижчим за такий у щурів інтактної групи. Зазначене підтверджується результатами аналізу вмісту оксипроліну в суглобовому хрящі, який показав на 23,72 % більше значення, ніж у контрольних тварин (табл. 1). Відношення вмісту білковозв'язаної фракції гідроксипроліну до вмісту вільної фракції у даній групі щурів переважало таке в контрольних тварин на 45,81 %, але поступалося показнику інтактних щурів на 30,37 % (табл. 1).

Хоча катаболізм колагену, оцінюваний за вмістом фракції вільного оксипроліну в сироватці крові, після лікування експериментальних тварин досліджуваною композицією знижувався, руйнування колагенових структур відбувалось на 14,46 % інтенсивніше, ніж в аналогічних здорових щурів.

Композиція глюкозаміну гідрохлориду з глюкозаміну ацетилсаліцилатом у співвідношенні 1:1 діяла на гіаліновий хрящ експериментальних тварин з кортикостероїдною дистрофією більш сприятливо, ніж композиція з тих же компонентів у співвідношенні 1:2, що, ймовірно, стало наслідком оптимальніших доз компонентів.

Аналіз показників, що характеризують обмін колагену і фібрилярних колагеноподібних білків, які є структурними компонентами сполучної тканини, – вмісту оксипроліну в сироватці крові та суглобовому хрящі показав повну нормалізацію досліджуваних процесів. Так, після лікування даною композицією в піддослідних тварин на 82,96 % збільшувався вміст у сироватці крові фракції білковозв'язаного оксипроліну, що свідчить про відповідну інтенсифікацію біосинтезу колагену та колагеноподібних білків (табл. 1).

Таблиця 1 – Зміни показників обміну колагену в сироватці крові та суглобовому хрящі експериментальних тварин з кортикостероїдною дистрофією внаслідок лікування композиціями глюкозаміну гідрохлориду з глюкозаміну ацетилсаліцилатом

Умови досліджу, n=6	Вміст у сироватці крові, мг/л				Вміст загального гідроксипроліну в суглобовому хрящі, г/100 г	Відношення вмісту загального гідроксипроліну в суглобовому хрящі до його вмісту в сироватці крові, л/100 г	Відношення вмісту білковозв'язаної фракції гідроксипроліну сироватки крові до вмісту його вільної фракції, од.
	вільний	пептидно-зв'язаний	білковозв'язаний	сума гідроксипроліну			
Інтактні тварини, n=6	4,15±0,15	3,97±0,14	5,18±0,12	13,30±0,33	4,28±0,17	0,321±0,025	1,248±0,072
Контрольна група, n=6	5,21±0,16 +25,54 % ¹⁾ p<0,05 ¹⁾	4,25±0,12 +7,05 % ¹⁾ p>0,05 ¹⁾	3,11±0,11 -39,96 % ¹⁾ p<0,05 ¹⁾	12,57±0,27 -5,49 % ¹⁾ p>0,05 ¹⁾	3,12±0,07 -27,10 % ¹⁾ p<0,01 ¹⁾	0,248±0,023 -22,74 % ¹⁾ p>0,05 ¹⁾	0,596±0,034 -52,24 % ¹⁾ p<0,001 ¹⁾
Глюкозаміну гідрохлорид+ глюкозаміну ацетилсаліцилат 1:2, 100 мг/кг	4,75±0,20 +14,46 % ¹⁾ p<0,05 ¹⁾ -8,83 % ²⁾ p>0,05 ²⁾	4,19±0,12 +5,54 % ¹⁾ p>0,05 ¹⁾ -1,41 % ²⁾ p>0,05 ²⁾	4,13±0,15 -20,27 % ¹⁾ p<0,05 ¹⁾ +32,82 % ²⁾ p<0,05 ²⁾	13,07±0,31 -1,73 % ¹⁾ p>0,05 ¹⁾ -3,98 % ²⁾ p>0,05 ²⁾	3,86±0,09 -9,81 % ¹⁾ p>0,05 ¹⁾ +23,72 % ²⁾ p<0,05 ²⁾	0,295±0,021 -8,09 % ¹⁾ p>0,05 ¹⁾ +18,95 % ²⁾ p>0,05 ²⁾	0,869±0,049 -30,37 % ¹⁾ p<0,01 ¹⁾ +45,81 % ²⁾ p<0,001 ²⁾
Глюкозаміну гідрохлорид+ глюкозаміну ацетилсаліцилат 1:1, 100 мг/кг	4,15±0,17 +0,00 % ¹⁾ p>0,05 ¹⁾ -20,35 % ²⁾ p<0,05 ²⁾	4,12±0,19 +3,78 % ¹⁾ p>0,05 ¹⁾ +3,06 % ²⁾ p>0,05 ²⁾	5,65±0,13 +9,85 % ¹⁾ p>0,05 ¹⁾ +82,96 % ²⁾ p<0,001 ²⁾	13,92±0,34 +4,66 % ¹⁾ p>0,05 ¹⁾ +10,74 % ²⁾ p>0,05 ²⁾	4,26±0,10 -0,47 % ¹⁾ p>0,05 ¹⁾ +36,54 % ²⁾ p<0,001 ²⁾	0,306±0,025 -4,67 % ¹⁾ p>0,05 ¹⁾ +23,39 % ²⁾ p>0,05 ²⁾	1,361±0,073 p>0,05 ¹⁾ +9,06 % ¹⁾ +128,35 % ²⁾ p<0,001 ²⁾
Глюкозаміну гідрохлорид+ глюкозаміну ацетилсаліцилат 2:1, 100 мг/кг	4,20±0,16 +1,24 % ¹⁾ p>0,05 ¹⁾ -19,39 % ²⁾ p<0,05 ²⁾	3,95±0,12 -0,53 % ¹⁾ p>0,05 ¹⁾ -7,06 % ²⁾ p>0,05 ²⁾	5,81±0,11 +12,16 % ¹⁾ p<0,05 ¹⁾ +86,82 % ²⁾ p<0,001 ²⁾	13,96±0,27 +4,96 % ¹⁾ p>0,05 ¹⁾ +11,06 % ²⁾ p>0,05 ²⁾	4,01±0,14 -6,31 % ¹⁾ p>0,05 ¹⁾ +28,53 % ²⁾ p<0,01 ²⁾	0,287±0,028 -10,59 % ¹⁾ p>0,05 ¹⁾ +15,73 % ²⁾ p>0,05 ²⁾	1,383±0,070 +10,82 % ¹⁾ p>0,05 ¹⁾ +132,05 % ²⁾ p<0,001 ²⁾

Примітка. ¹⁾ – порівняно з даними групи інтактних тварин; ²⁾ – порівняно з даними групи контрольних тварин.

Зазначені результати корелюють із вмістом оксипроліну, знайденого в суглобовому хрящі експериментальних тварин, пролікованих аналізованою композицією. Так, хрящова тканина після лікування композицією глюкозаміну гідрохлориду з глюкозаміну ацетилсаліцилатом у співвідношенні 1:1 містила стільки ж оксипроліну, скільки й до моделювання кортикостероїдної дистрофії (табл. 1). Разом із тим, мало місце зниження на 20,35 % вмісту фракції вільного оксипроліну в сироватці крові, що формується при руйнуванні раніше синтезованого колагену. Анаболічні процеси в обміні колагену переважали над катаболічними, про що свідчило відношення вмісту білковозв'язаної фракції гідроксипроліну до вмісту його вільної фракції у сироватці крові, що відповідало такому в інтактних тварин, переважаючи даний показник у контрольних щурів на 128,36 % (табл. 1).

Зазначені факти потрапляють у межі наших уявлень про активацію глюкозаміном, що входить до складу розглянутої композиції, біосинтезу колагену.

При аналізі показників, що характеризують метаболізм колагену та колагеноподібних білків у експериментальних тварин після лікування композицією глюкозаміну гідрохлориду з глюкозаміну ацетилсаліцилатом у співвідношенні 2:1 за масою, виявлено, що розглянута композиція мала позитивну дію. Це проявлялося підвищенням на 86,82 % вмісту фракції білковозв'язаного гідроксипроліну в сироватці крові, що характерно для активації біосинтезу колагену. Разом із тим, мало місце зниження вмісту фракції вільного гідроксипроліну на 19,32 % у сироватці крові тварин, що є маркером інтенсивності катаболічних процесів у системі “колаген-гідроксипролін”.

З урахуванням збільшення на 36,54 % вмісту колагену в суглобовому хрящі тварин розглянутої групи та за відсутності відмінності зі здоровими щурами можна зробити висновок про виражене стимулювання біосинтезу та накопичення колагену і колагеноподібних білків у гіаліновій хрящовій тканині з боку аналізованої композиції. Підтверджує зазначене вище вміст гідроксипроліну в суглобовому хрящі експериментальних тварин, пролікованих розглянутою композицією, який був на 28,53 % вищим, ніж у нелікованих, що відповідало рівню такого у здорових тварин (табл. 1), Відношення вмісту білковозв'язаної фракції гідроксипроліну до вмісту його вільної фракції у сироватці крові відповідало такому в інтактних тварин, переважаючи даний показник у контрольних щурів на 132,05 % (табл. 1), що характеризує переважання біосинтетичних процесів в обміні колагену над катаболічними.

ВИСНОВКИ. 1. У всіх досліджених співвідношеннях зазначені композиції мали виражений хондропротекторний ефект з поєднанням стимулювальної дії на біосинтез разом із пригніченням катаболізму колагену. Даний ефект був максимальним у композиції зі співвідношенням компонентів 2:1 та 1:1 за масою.

2. Композиція глюкозаміну гідрохлориду з глюкозаміну ацетилсаліцилатом із масовим співвідношенням 1:2 мала менш виражені хондропротекторні властивості, хоча також позитивно впливала на метаболізм колагену в дистрофічній сполучній тканині.

3. Найбільш перспективною для створення нового протиаартрозного препарату визнано композицію глюкозаміну гідрохлориду з глюкозаміну ацетилсаліцилатом у співвідношенні 1:1 за масою.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Корж Н.А., Хвисьок А.Н., Дедух Н.В. и др. Остеоартроз. Консервативная терапия / Под ред. Н.А. Коржа, Н.В. Дедух, И.А. Зупанца. – Х.: Золотые страницы, 2007. – 424 с.
2. Лапач С.Н., Губенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. – К.: Морион, 2000. – 320 с.
3. Слуцкий Л.И. Биохимия нормальной и патологически измененной соединительной ткани. – Л.: Медицина, 1969. – 375 с.
4. Beecher B.R., Martin J.A., Pedersen D.R. et al. Antioxidants block cyclic loading induced chondrocyte death // Iowa Orthop. J. – 2007. – **27**. – P. 1-8.
5. Gray R.G., Gottlieb N.L. Intra-articular corticosteroids. An Updated Assessment // Clin. Orthop. Rel. Res. – 1983. – № 177. – P. 235-263.
6. Herrero-Beaumont G., Rovati L.C., Castaneda S. et al. The reverse glucosamine sulfate pathway:

application in knee osteoarthritis // Expert. Opin. Pharmacother. – 2007. – **8**. – P. 215-225.

7. Ishiguro N., Kojima T. Role of aggrecanase and MMP in cartilage degradation // Clin. Calcium. – 2004. – **14**, № 7. – P. 38-44.

8. Monfort J., Garcia-Giralt N., Lopez-Armada M.J. et al. Decreased metalloproteinase production as a response to mechanical pressure in human cartilage: a mechanism for homeostatic regulation // Arthritis Res. Ther. – 2006. – **8**, № 5. – P. 149.

9. Stegemann H., Stalder R. Determination of hydroxyproline // Clin. Chim. Acta. – 1967. – № 2. – P. 267-273.

10. Sui Y., Lee J.H., DiMicco M.A. et al. Mechanical injury potentiates proteoglycan catabolism induced by interleukin-6 with soluble interleukin-6 receptor and tumor necrosis factor alpha in immature bovine and adult human articular cartilage // Arthritis Rheum. – 2009. – **60**. – P. 2985-2996.

С.М. Осадченко

УКРАИНСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ ЦЕНТР СЕРТИФИКАЦИИ МОЗ УКРАИНЫ, КИЕВ

КОМПОЗИЦИИ ГЛЮКОЗАМИНА ГИДРОХЛОРИДА С ГЛЮКОЗАМИНА АЦЕТИЛСАЛИЦИЛАТОМ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА МЕТАБОЛИЗМ КОЛЛАГЕНА

Резюме

В статье представлены результаты биохимического исследования изменений метаболизма и накопления коллагена у экспериментальных животных с моделью кортикостероидной дистрофии соединительной ткани под влиянием лечения композициями глюкозамин гидрохлорида с глюкозамин ацетилсаліцилатом в соотношениях 2:1; 1:1 и 1:2 по массе в дозе 100 мг/кг.

Отмечено, что в соотношениях 2:1 и 1:1 указанные композиции оказывали выраженный стимулирующий эффект на биосинтез коллагена, одновременно снижая его катаболизм. Композиция с соотношением данных компонентов 1:2 была значительно менее активной.

На основании результатов исследований в качестве базовой для создания нового противоартрозного препарата рекомендована композиция глюкозамина гидрохлорида с глюкозамина ацетилсалицилатом в соотношении 1:1 по массе.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: хрящ, кровь, коллаген, биохимия, эксперимент, остеоартроз, глюкозамина гидрохлорид, кислота ацетилсалициловая.

S.M. Osadchenko

UKRAINIAN MEDICAL CENTRE OF CERTIFICATION OF
MINISTRY OF HEALTH PROTECTION OF UKRAINE, KYIV

COMPOSITIONS OF GLUCOSAMINE HYDROCHLORIDE WITH GLUCOSAMINE ACETYLSALICYLATE AND THEIR INFLUENCE ON COLLAGEN METABOLISM

Summary

In the article the results of biochemical research of changing of the metabolism, accumulation of collagen in experimental animals with model of corticosteroidal dystrophy after influence therapy by glucosamine hydrochloride with glucosamine acetylsalicylate compositions 2:1; 1:1 and 1:2 on mass in doses 100 mg/kg have been presented.

There have been established that these compositions in proportions 2:1 and 1:1 show strong stimulating effect on collagen biosynthesis, with simultaneous decreasing of its catabolism.

The composition in proportion 1:2 has been greatly less active.

On the base of researches results as a main for the creating of new antiarthrotic drug the composition of glucosamine hydrochloride with glucosamine acetylsalicylate with proportion 1:1 on mass is recommended.

KEY WORDS: cartilage, blood, collagen, biochemistry, experiment, osteoarthritis, glucosamine hydrochloride, acid acetylsalicylic.

Отримано 01.11.10

Адреса для листування: С.М. Осадченко, Український медичний центр сертифікації МОЗ України, вул. Чигорина, 18, Київ, 01042, Україна.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

ГІПОКСІЯ ТА ГІПОКСІЯЗВ'ЯЗАНІ ТРАНСКРИПЦІЙНІ ФАКТОРИ В ПАТОГЕНЕЗІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ВИРАЗКОВОГО КОЛІТУ В ЩУРІВ

Поверхневі епітеліоцити слизової оболонки товстої кишки перебувають у стані "фізіологічної гіпоксії". Розвиток експериментального виразкового коліту асоціюється зі збільшенням гіпоксії слизової оболонки товстої кишки та підвищенням експресії транскрипційного фактора HIF-1а. Встановлено, що транскрипційна активність гіпоксіячутливого фактора Egr-1 не залежить від HIF-1 в патогенезі експериментального виразкового коліту. Egr-1 взаємодіє з транскрипційними факторами GAG, ADR1, GATA-1/2, CREB-BP1, FKHR в ядрах клітин слизової оболонки товстої кишки, і ступінь цієї взаємодії змінюється при розвитку експериментального виразкового коліту.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **гіпоксія, HIF-1а, Egr-1, виразковий коліт.**

ВСТУП. Епітеліальний шар слизової оболонки кишечника – це перша лінія захисту організму від дії агресивних факторів різного генезу (HCl, травні ферменти, жовч, бактерії та ін.) і важливий компонент підтримання гомеостазу. Цілісність епітеліального шару значною мірою залежить від нормального кровопостачання слизової оболонки кишечника та чутлива до гіпоксії. Встановлено, що ішемія-гіпоксія є одним з основних патогенетичних факторів розвитку уражень слизової оболонки травного тракту [12, 13].

Неспецифічний виразковий коліт (ВК) – хронічне запальне захворювання товстої кишки, що характеризується дистрофічними та атрофічними змінами поверхневого епітелію з ділянками виразок, ерозій, мікроерозій [1]. За допомогою інтравітальної мікроскопії з флуоресцентноміченими еритроцитами було показано зменшення кровотоку в капілярах товстої кишки в гостру фазу ВК, спричиненого тринітробензолсульфонієвою кислотою чи мітоміцином-С, у щурів, що асоціювалось з гістопатоморфологічними змінами слизової оболонки кишечника [5, 9]. О.А. Natoum та співавт. [7], досліджуючи вазодилататорну відповідь мікросудин кишечника пацієнтів із хворобою Крона та ВК, показали значне її зменшення в артеріолах хронічноуражених ділянок кишечника порівняно з артеріолами неуражених ділянок. Дисфункція ендотелію мікросудин супроводжувалась розвитком оксидативного

стресу. Більш того, розвиток гіпоксії в епітеліальних клітинах товстої кишки був показаний при експериментальному ВК [8].

На сьогодні все більше підтверджень ролі гіпоксії та редокс-стану в трансактивації генів, що беруть участь у відповіді клітини на руйнівну дію оксидативного стресу [3, 17].

У попередніх дослідженнях на моделях експериментального ВК ми показали збільшення експресії та транскрипційної активності редокс-чутливого транскрипційного фактора ранньої відповіді Egr-1, що відіграє центральну роль у трансактивації генів при судинній патології [2]. Гіпоксіяіндуцибельний фактор-1 (HIF-1 α) є основним транскрипційним фактором адаптації клітини до дії гіпоксії. Синергічна взаємодія між Egr-1 та HIF-1 була показана при гіпоксіяіндукованої експресії генів [4, 11].

Метою даної роботи було дослідити зміни експресії HIF-1 та його взаємодії з Egr-1 в асоціації з розвитком гіпоксії слизової оболонки товстої кишки на ранніх етапах експериментального ВК.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проводили на щурах-самках лінії Sprague-Dawley масою 160-200 г. Виразковий коліт спричиняли шляхом одноразового ректального введення (7 см від анального отвору) 0,1 мл 6 % розчину йодоацетаміду (Sigma, США), розчиненого в 1 % розчині метилцелюлози (Sigma, США), за допомогою гумового катетера S8 (Rusch, Німеччина) [14]. Тваринам контрольної групи вводили 0,1 мл 1 % розчину метилце-

© Г.М. Толстанова, 2010.

Медична хімія – т. 12, № 4, 2010

люлози. Щурів умертвляли шляхом інгаляції з CO₂ і наступною цервікальною дислокацією через 15, 30 хв, 1, 2 та 6 год після введення йодоацетаміду чи метилцелюлози.

Для визначення гіпоксії в слизовій оболонці товстої кишки щурів ми застосовували Нурохурprobe™-1 набір (Natural Pharmacia International, Inc, США). Цей метод оснований на утилізації низькомолекулярного маркера, пімонідазолу, який після внутрішньовенного введення формує комплекс з тіоловмісними білками лише тих клітин, що мають знижений рівень кисню. Щурів наркотизували аерозольним анестетиком ізофлураном, після цього внутрішньовенно вводили пімонідазол HCl (6 мг/100 г) за 90 хв до автопсії. Автопсію проводили через 15, 30 хв та 1 год після ректального введення 6 % розчину йодоацетаміду чи 1 % розчину метилцелюлози (контрольна група). Під час автопсії видаляли 7 см товстої кишки від анального отвору та фіксували у 10 % буферному формаліні. Зафіксований сегмент товстої кишки обробляли традиційними гістологічними методами для виготовлення парафінових зрізів. Імуногістохімічне забарвлення виконували на парафінових зрізах товстої кишки товщиною 5 мкм. Зрізи депарафінізували, зневоднювали та блокували ендogenous пероксидази 3 % H₂O₂/H₂O. Епітопи відновлювали шляхом підігрівання в мікрохвильовій печі, використовуючи Dako відновлюючий розчин, pH=10,00 (BD PharMingen, США). Охолоджені зрізи інкубували 12 год при температурі 4 °C з мишачим моноклональним антитілом проти MAb1, що зв'язується з комплексом "пімонідазол-тіоловмісні білки" клітин у стані гіпоксії. Як вторинне антитіло використовували біотинильоване антитіло з наступною інкубацією в міченій стрептавідин-біотином пероксидазі. Для детекції застосовували ABC (комплекс "авідин-біотин-пероксидаза") метод. З метою визначення специфічності первинного антитіла виконували імуноабсорбцію антитіла як контроль. Імуногістохімічно забарвлені ділянки товстої кишки аналізували, застосовуючи систему відеозображення MetaMorph 7.0 (Molecular Devices, США) та розраховуючи розмір зони з позитивним забарвленням відносно загальної зони слизової оболонки.

Експресію білка HIF-1α визначали методом Вестерн блот, як описано раніше [2]. Моноклональне антитіло проти HIF-1α (1:200, Novus Biologicals, LLC., США) використовували для визначення рівня білка в стінці товстої кишки з наступною інкубацією із вторинним HRP-кон'югованим антитілом (1:3000, Santa-Cruz Biotech., США). Експресію білка GAPDH (анти

GAPDH антитіло 1:3000; EnCor Biot, США) застосовували як контроль кількості загальних білків у зразку. Візуалізацію Вестерн блот проводили ECL-реагентом (Amersham Biosciences, США). Інтенсивність сигналу визначали за допомогою оптико-денситометричного аналізу з використанням програмного забезпечення Phoretix 1D.

Для визначення ступеня транскрипційної взаємодії Egr-1 з HIF-1 в слизовій оболонці товстої кишки щурів на фоні ВК, спричиненого йодоацетамідом, використовували TranSignal TF-TF Interaction Assay Kit TranSignal™ Protein/DNA Array мембрану – II (Panomics Inc., США) згідно з інструкцією виробника, як описано раніше [2]. Комплекси "олігонуклеотид-білок" імунопреципітували із застосуванням 2 мкг/зразок антитіла проти Egr-1 (Santa-Cruz Biotechnology, Inc, США). Візуалізацію інтенсивності сигналу ДНК-проб проводили за допомогою кон'югату стрептавідину з пероксидазою хрому з наступною інкубацією з ECL-реагентом (Amersham Biosciences, США).

Статистичну обробку результатів проводили за t-тестом Стюдента. Дані представлено у вигляді M±σ, n – кількість тварин у групі. Статистично значущою для всіх показників вважали різницю p<0,05.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. У першій частині роботи ми дослідили розвиток гіпоксії слизової оболонки товстої кишки щурів на ранніх стадіях ВК, спричиненого йодоацетамідом. Для визначення ступеня гіпоксії використовували сучасний імуногістохімічний метод "Нурохурprobe-1", що дозволяє візуалізувати клітини тканин, які мають концентрацію кисню менш ніж 14 мкМ, що відповідає парціальному тиску pO₂=100 мм рт. ст. при 37 °C [21]. В наших дослідженнях поверхневі епітеліальні клітини слизової оболонки товстої кишки контрольних щурів (1 % розчин метилцелюлози) акумулювали комплекси пімонідазолу з тіоловмісними білками, що свідчить про базальний рівень гіпоксії в даній тканині за нормальних умов (рис. 1, А). Ці дані збігаються з результатами С.Т. Taylor та S.P. Colgan [22], які показали наявність "фізіологічної гіпоксії" в тонкій та, особливо, товстій кишках і її відсутність в інших органах (легені, печінка). Автори пояснили це явище наявністю значного градієнта кисню між анаеробним середовищем просвіту кишки та добре васкуляризованою слизовою оболонкою кишечника.

Ректальне введення йодоацетаміду викликало статистично значуще збільшення гіпоксії епітеліальних клітин слизової оболон-

ки товстої кишки вже через 30 хв після його введення ($p < 0,05$), що передувало розвитку уражень [14]. Аналогічна картина спостерігалась через 1 год після введення йодоацетаміду (рис. 1, А). Таким чином, розвиток гіпоксії є патогенетичним фактором у виникненні уражень товстої кишки при експериментальному ВК. Гіпоксія – це невід’ємна складова гострого запалення, що призводить до акумуляції лактату і розвитку метаболічного ацидозу. Такі зміни в тканинному метаболізмі виникають у результаті інфільтрації клітин запалення, переважно нейтрофілів та моноцитів [10].

HIF-1 – $\alpha\beta$ -гетеродимерний транскрипційний фактор, що належить до родини “спіраль–поворот–спіраль” транскрипційних факторів і є ключовим регулятором кисневого гомеостазу (полегшує доставку кисню та адаптацію до виснаження кисню). Активація HIF-1 залежить від стабілізації чутливої до кисню α -субодиниці, яка потім транслюється в

ядро клітини, де формується комплекс із HIF-1 β та ко-активаторами транскрипції цАМФ-відповідального елемента зв’язування білка (зв’язуючий білок (СВР) та р300) [16].

Розвиток йодоацетамідвикликаного ВК характеризується вірогідним підвищенням експресії білка HIF-1 α в слизовій оболонці товстої кишки щурів. Так, у контрольній групі оптична густина смужок імуноблотингу становила ($0,26 \pm 0,008$) ум. од., через 30 хв після введення йодоацетаміду вона збільшилась до ($0,33 \pm 0,01$) ум. од., через 1 год – до ($0,69 \pm 0,01$) ум. од. ($p < 0,05$), через 2 год – ($1,07 \pm 0,16$) ум. од. ($p < 0,05$), а через 6 год – ($1,30 \pm 0,10$) (рис. 1, Б).

У попередніх дослідженнях ми показали провідну роль фактора росту кровеносних судин (VEGF) в патогенезі ВК [23], що було підтверджено іншими дослідниками [15]. D. Shweiki та співавт. [19] у дослідях на різних культурах клітин, підданих дії гіпоксії, продемонстрували швидке значуще підвищення ек-

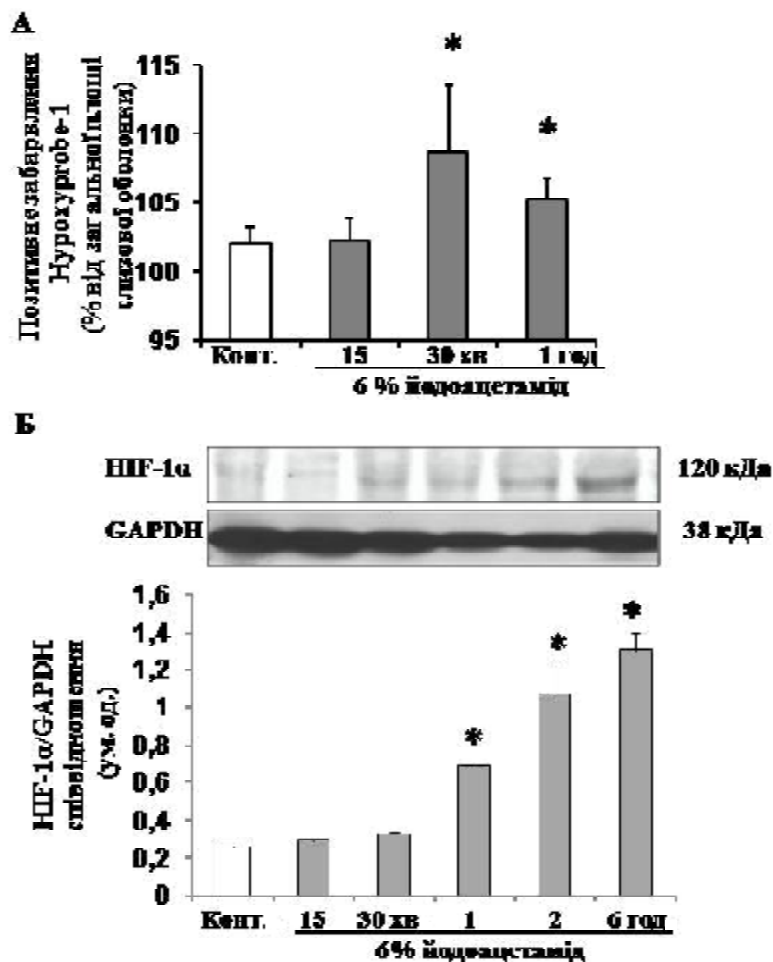


Рис. 1. Рівень гіпоксії в слизовій оболонці товстої кишки щурів (А) та зміни експресії білка гіпоксіячутливого транскрипційного фактора HIF-1 α (Б) в нормі й різні терміни виразкового коліту, спричиненого йодоацетамідом. Рівень білків визначали методом Вестерн блот. $n=3$, $M \pm SD$. * – $p < 0,05$ відносно показників у контрольній групі щурів (Конт.).

спресії мРНК VEGF, який повертався до контрольного рівня при відновленні нормальної оксигенації. HIF-1 α , зв'язуючись із гіпоксіячутливим елементом промотора VEGF гена, є критичним у запуску його експресії [6]. Інший транскрипційний фактор Egr-1 належить до гіпоксіячутливих факторів і запускає експресію багатьох гіпоксіячутливих генів, таких, як тканинний фактор, різні фактори росту, цитокини/хемокіни та рецептори адгезії [20]. ДНК-зв'язуючий домен Egr-1 був також знайдений у промоторній ділянці VEGF гена [18]. Раніше ми показали збільшення транскрипційної активності Egr-1 в слизовій оболонці товстої кишки щурів при йодоацетамідвикликаному коліті [2].

Для дослідження можливої взаємодії між Egr-1 та HIF-1 в процесах трансактивації генів при експериментальному ВК ми провели TranSignal TF-TF Interaction Assay. Даний метод дозволяє визначити ступінь зв'язування Egr-1

з іншими транскрипційними факторами, cis-елементи яких локалізовані на тест-мембрані. Ми використовували TranSignal™ Protein/DNA Array мембрану – II, що містить cis-елементи до 96 різних транскрипційних факторів, у тому числі HIF-1. В результаті проведених досліджень не було виявлено cis-елемента до HIF-1 серед cis-елементів, отриманих в результаті імунопреципітації антитілом проти Egr-1-білкових комплексів “Egr-1-транскрипційні фактори/cis-елементи” ядерної фракції білків слизової оболонки товстої кишки щурів у нормі та на фоні йодоацетамідвикликаного коліту. Хоча встановлено, що за нормальних умов Egr-1 ядра перебував у зв'язаному стані з транскрипційними факторами GAG, ADR1, GATA-1/2, CREB-VP1, FKHR. З розвитком йодоацетамідвикликаних уражень слизової оболонки товстої кишки взаємодія між Egr-1 та цими факторами знижувалась (рис. 2).

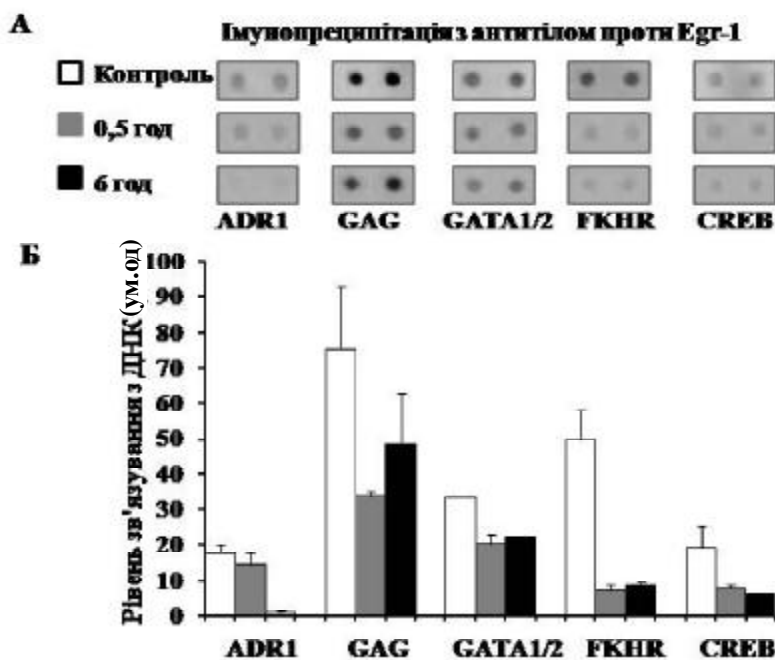


Рис. 2. Рівень взаємодії Egr-1 з транскрипційними факторами (ADR1, GAG, GATA1/2, FKHR, CREB) у нормі (контроль) та різні терміни розвитку виразкового коліту, спричиненого йодоацетамідом (0,5 та 6 год). (А) Аналіз проводили з використанням TranSignal™ Protein/DNA Array мембрани – II, яка містить парні ДНК-проби до cis-елементів 96 транскрипційних факторів. (Б) Денситометричний аналіз рівня зв'язування з ДНК. n=2.

ВИСНОВКИ. 1. Поверхневі епітеліоцити слизової оболонки товстої кишки перебувають у стані “фізіологічної гіпоксії”.

2. Розвиток експериментального ВК асоціюється зі збільшенням гіпоксії слизової оболонки товстої кишки та підвищенням експресії транскрипційного фактора HIF-1 α .

3. Транскрипційна активність гіпоксіячутливого фактора Egr-1 не залежить від HIF-1 в патогенезі експериментального ВК.

4. Egr-1 взаємодіє з транскрипційними факторами GAG, ADR1, GATA-1/2, CREB-VP1, FKHR в ядрах клітин слизової оболонки товстої кишки, і ступінь цієї взаємодії змінюється при розвитку експериментального ВК.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Белоусова Е.А. Язвенный колит и болезнь Крона. – М.: Триада, 2002. – 127 с.
2. Толстанова Г.М., Остапченко Л.І. Взаємодія транскрипційних факторів Egr-1 та Sp1 в патогенезі запальних захворювань кишечника // Мед. хімія. – 2010. – № 3. – С. 10-15.
3. Bunn H.F., Poyton R.O. Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia // *Physiol. Rev.* – 1996. – **76**. – P. 839-885.
4. Evinger M.J., Cikos S., Nwafor-Anene V. et al. Hypoxia activates multiple transcriptional pathways in mouse pheochromocytoma cells // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2002. – **971**. – P. 61-65.
5. Foitzik T., Kruschewski M., Kroesen A. et al. Does microcirculation play a role in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases? Answers from intravital microscopic studies in animal models // *Int. J. Colorectal. Dis.* – 1999. – **14**. – P. 29-34.
6. Forsythe J.A., Jiang B.H., Iyer N.V. et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1 // *Mol. Cell. Biol.* – 1996. – **16**, № 9. – P. 4604-4613.
7. Hatoum O.A., Miura H., Binion D.G. The vascular contribution in the pathogenesis of inflammatory bowel disease // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2003. – **285**. – P. 1791-1796.
8. Karhausen J., Furuta G.T., Tomaszewski J.E. et al. Epithelial hypoxia-inducible factor-1 is protective in murine experimental colitis // *J. Clin. Invest.* – 2004. – **114**. – P. 1098-1106.
9. Kruschewski M., Foitzik T., Perez-Canto A. et al. Changes of colonic mucosal microcirculation and histology in two colitis models // *Dig. Dis. Sci.* – 2001. – **46**. – P. 2336-2343.
10. Lewis J.S., Lee J., Underwood J.C.E. et al. Macrophage responses to hypoxia: implications for disease mechanisms // *J. Leukoc. Biol.* – 1999. – **66**. – P. 889-900.
11. Liao H., Hyman M.C., Lawrence D.A., Pinsky D.J. Molecular regulation of the PAI-1 gene by hypoxia: contributions of Egr-1, HIF-1 α , and C/EBP α // *FASEB J.* – 2007. – **21**, № 3. – P. 935-949.
12. Oh T.Y., Lee J.S., Ahn B.O. et al. Oxidative stress is more important than acid in the pathogenesis of reflux oesophagitis in rats // *Gut.* – 2001. – **49**. – P. 364-371.
13. Rezaei A., Parker R.D., Abdollahi M. Oxidative stress and pathogenesis of inflammatory bowel disease: an epiphenomenon or the cause? // *Dig. Dis. Sci.* – 2007. – **52**. – P. 2015-21.
14. Satoh H., Sato F., Takami K., Szabo S. New ulcerative colitis model induced by SH blockers in rats and the effects of antiinflammatory drugs on the colitis // *Jpn. J. Pharmacol.* – 1997. – **73**. – P. 299-309.
15. Scaldaferrri F., Vetrano S., Sans M. VEGF-A links angiogenesis and inflammation in inflammatory bowel disease pathogenesis // *Gastroenterology.* – 2009. – **136**, № 2. – P. 585-595.
16. Semenza G.L. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing // *Curr. Opin. Cell. Biol.* – 2001. – **13**, № 2. – P. 167-171.
17. Semenza G.L. Surviving ischemia: adaptive response mediated by hypoxia-inducible factor 1 // *J. Clin. Invest.* – 2000. – **106**. – P. 809-812.
18. Shimoyamada H., Yazawa T., Sato H. et al. Early growth response-1 induces and enhances vascular endothelial growth factor- α expression in lung cancer cells // *Am. J. Pathol.* – 2010. – **177**, № 1. – P. 70-83.
19. Shweiki D., Itin A., Soffer D., Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis // *Nature.* – 1992. – **359**, № 6398. – P. 843-845.
20. Silverman E.S., Collins T. Pathways of Egr-1-mediated gene transcription in vascular biology // *Am. J. Pathol.* – 1999. – **154**, № 3. – P. 665-670.
21. Tarnawski A., Pai R., Deng X. et al. Aging gastropathy-novel mechanisms: hypoxia, up-regulation of multifunctional phosphatase PTEN, and proapoptotic factors // *Gastroenterology.* – 2007. – **133**. – P. 1938-1947.
22. Taylor C.T., Colgan S.P. Hypoxia and gastrointestinal disease // *Mol. Med.* 2007. – **85**, № 12. – P. 1295-1300.
23. Tolstanova G., Khomenko T., Deng X. et al. Neutralizing anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) antibody reduces severity of experimental ulcerative colitis in rats: Direct evidence for the pathogenic role of VEGF // *JPET.* – 2009. – **328**, № 3. – P. 749-757.

А.Н. Толстанова

КИЕВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ТАРАСА ШЕВЧЕНКО

ГИПОКСИЯ И ГИПОКСИЯСВЯЗАННЫЕ ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ В ПАТОГЕНЕЗЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЯЗВЕННОГО КОЛИТА У КРЫС

Резюме

Поверхностные эпителиоциты слизистой оболочки толстой кишки находятся в состоянии "физиологической гипоксии". Развитие экспериментального язвенного колита ассоциируется с увеличением гипоксии слизистой оболочки толстой кишки и повышением экспрессии транскрипционного фактора HIF-1 α . Установлено, что транскрипционная активность гипоксиячувствительного фактора Egr-1 не зависит от HIF-1

в патогенезе экспериментального язвенного колита. *Egr-1* взаимодействует с транскрипционными факторами GAG, ADR1, GATA-1/2, CREB-BP1, FKHR в ядрах клеток слизистой оболочки толстой кишки, и степень этого взаимодействия изменяется в динамике развития экспериментального язвенного колита.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гипоксия, HIF-1а, Egr-1, язвенный колит.

H.M. Tolstanova
TARAS SHEVCHENKO KYIV NATIONAL UNIVERSITY

HYPOXIA AND HYPOXIA-RELATED TRANSCRIPTION FACTORS IN THE PATHOGENESIS OF EXPERIMENTAL ULCERATIVE COLITIS IN RATS

Summary

“Physiological hypoxia” is a feature of the surface epithelial cells of colonic mucosa. The development of ulcerative colitis is associated with up-regulation of hypoxia in colonic mucosa and increased levels of transcription factor HIF-1а. Transcriptional activity of hypoxia-sensitive factor Egr-1 is HIF-1 independent in the pathogenesis of ulcerative colitis. Nuclear Egr-1 interacts with others transcription factors (GAG, ADR1, GATA-1/2, CREB-BP1, FKHR) in colonic mucosa of control rats and during experimental ulcerative colitis.

KEY WORDS: hypoxia, HIF-1а, Egr-1, ulcerative colitis.

Отримано 19.10.10

Адреса для листування: Г.М. Толстанова, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64, Київ-33, 01033, Україна.

О.М. Горошко, І.І. Заморський, О.В. Геруш, І.В. Геруш, І.М. Сахацька
 БУКОВИНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ЧЕРНІВЦІ

ЗМІНИ ПРОТЕОЛІТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ПЛАЗМИ КРОВІ, СЕЧІ ТА ТКАНИНИ НИРОК ЩУРІВ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ ГОСТРІЙ НИРКОВІЙ НЕДОСТАТНОСТІ ТА ЇЇ КОРЕКЦІЯ КОРВІТИНОМ

В експерименті на білих щурах вивчено вплив корвітину на зміни протеолітичної активності плазми крові, сечі та тканини нирок щурів при гліцероловій гострій нирковій недостатності, викликаній внутрішньом'язовим введенням 50 % розчину гліцерину, та проведено корекцію корвітином. Корвітин вводили внутрішньоочеревинно у дозі 8 мг/кг протягом 7 діб один раз на день. Доведено, що корвітин відновлює протеолітичний потенціал рідин організму (плазми крові, сечі) й тканин нирок тварин.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: гостра ниркова недостатність, корвітин, протеолітична активність.

ВСТУП. У патогенезі розвитку ГНН важливе місце займає порушення окисно-відновних процесів внаслідок активації антиоксидантної системи вільнорадикального окиснення на фоні дисбалансу АОС [11]. Відомо, що окисненим білкам притаманна підвищена чутливість до протеолізу, й фактично в організмі протеолітичному розщепленню піддаються окиснені білки, а не нативні [7]. У нормі існує динамічна рівновага між активністю протеаз та їх інгібіторів. Надмірна активація системи необмеженого протеолізу є важливою патогенетичною ланкою в розвитку деструктивних, запальних та алергічних реакцій [8]. Протеолітичні ферменти не тільки беруть участь у розщепленні білків у тканинах і травному тракті, але і мають регульовальне значення, оскільки є одним із механізмів біологічного контролю функцій органів і тканин організму [2]. Інкреторна діяльність нирок забезпечує баланс компонентів системи гемостазу, в т.ч. протеолітичної та фібринолітичної активності. Зміни в діяльності нирок можуть викликати порушення процесів протеолізу і фібринолізу та навпаки [10], тому пошук шляхів корекції цих процесів є актуальним.

Метою дослідження було вивчити зміни протеолітичної активності при гліцероловій моделі гострої ниркової недостатності та з'ясувати можливість впливу корвітину на її активність у сечі, плазмі крові й тканині нирок при тривалому використанні препарату.

© О.М. Горошко, І.І. Заморський, О.В. Геруш, І.В. Геруш, І.М. Сахацька, 2010.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Експериментальні дослідження проводили на 21 нелінійному білому щурі масою 120-180 г. Піддослідних тварин було поділено на такі групи: 1-ша – контроль, тваринам вводили внутрішньоочеревинно воду для ін'єкцій в об'ємі, що є еквівалентним кількості розчину корвітину; 2-га – створювали модельну патологію нирок і вводили внутрішньоочеревинно воду для ін'єкцій в об'ємі, що є еквівалентним кількості розчину корвітину; 3-тя – тварини, які після моделювання патології одержували корвітин.

ГНН викликали шляхом внутрішньом'язового введення 50 % розчину гліцерину в дозі 8 мг/кг [3]. Препарати корвітину (Борщагівський ХФЗ, 2003 р.) вводили внутрішньоочеревинно в дозі 8 мг/кг у перерахунку на кверцетин протягом 7 днів. Дозу цього лікарського засобу обрали з огляду на дані літератури [5, 6, 9].

Вплив препаратів кверцетину на функцію нирок у тварин досліджували за умов водного навантаження організму. Водне навантаження створювали шляхом внутрішньошлункового введення питної води кімнатної температури в об'ємі 5 % від маси тіла, після чого збирали сечу протягом 2 год. Щурів забивали шляхом декапітації під легким ефірним наркозом, дотримуючись положень Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986). Забій тварин проводили на 48 год і 7 добу на фоні тривалого введення препаратів кверцетину.

Матеріалами дослідження були сеча, плазма крові, сироватка крові, гомогенат нирки. Ступінь пошкодження ниркової тканини при ГНН оцінювали за інтенсивністю протеолізу. Стан протеолітичної активності визначали на основі реакції з азосполуками [1]. Результати досліджень обробляли статистично за допомогою програми "Statgraphics" з використанням t-критерію Стюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. При дослідженні гліцеролової моделі ГНН (табл. 1-3) виявлено, що зміни стану крові відбувались при різкому пригніченні протеолітичної активності. За умов гліцеролової ГНН також знижувалися показники активності фібринолізу [4], ймовірно, внаслідок пошкодження проксимальних відділів каналців нефрону, що повинно було спричинити зменшення синтезу і, відповідно, активності урорінази. Зниження досліджуваних показників протеолітичної активності ми можемо пояснити одночасним зменшенням активності фібринолізу, оскільки процеси фібринолізу активують ферменти протеолізу.

Згідно з даними експерименту, при корекції ГНН корвітином протеолітична активність сечі була більшою щодо нелікованих тварин майже протягом усього експерименту. При багаторазовому введенні корвітину (табл. 1) відмічали підвищення протеолітичної актив-

ності сечі. Так, на 48 год та 7 добу експерименту лізис альбуміну зріс в 1,6 раза при використанні корвітину; лізис азоказеїну зріс в 1,9 раза на 48 год експерименту та в 1,7 раза на 7 добу. Показники розпаду азоколу під впливом препарату збільшувались, порівняно з нелікованими тваринами, при семиденному введенні у 2,3 раза.

У плазмі крові піддослідних тварин (табл. 2) також мало місце відновлення протеолітичної активності при використанні корвітину. Отже, інтенсивність лізису низькомолекулярних білків перевищувала показники нелікованих щурів: лізис азоальбуміну зріс на 48 год в 1,5 раза, на 7 добу – в 2,1 раза. Протеолітична деструкція високомолекулярних білків, визначена за лізисом азоказеїну, збільшилась на 48 год в 1,7 раза, на 7 добу – в 1,8 раза. Коллагенолітична активність плазми крові за лізисом азоколу під впливом препаратів кверцетину збільшувалася, порівняно з нелікованими тваринами, на 48 год у 2,6 раза.

Результати дослідження протеолітичної активності на тлі ГНН у тканині нирок (табл. 3) показали також достовірне зростання лізису азоальбуміну протягом експерименту. Так, на 48 год і 7 добу експерименту показники лізису азоальбуміну підвищились при використанні корвітину, відповідно, в 1,5 та 1,4 раза. Аналогічно зріс лізис азоказеїну при застосуванні корвітину: на 48 год і 7 добу експерименту – в

Таблиця 1 – **Зміни протеолітичної активності сечі щурів при гліцероловій гострій нирковій недостатності після багаторазового введення корвітину ($M \pm m$, $n=7$)**

Показники, які вивчали	Контроль	ГНН	ГНН+корвітин
		На 48 год експерименту	
Лізис азоальбуміну, $E_{440}/(\text{мл} \times \text{год})$	$7,12 \pm 0,56$	$3,65 \pm 0,21$ $p_1 < 0,001$	$5,79 \pm 0,28$ $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,001$
Лізис азоказеїну, $E_{440}/(\text{мл} \times \text{год})$	$6,79 \pm 0,39$	$3,43 \pm 0,29$ $p_1 < 0,001$	$6,57 \pm 0,44$ $p_2 < 0,001$
Лізис азоколу, $E_{440}/(\text{мл} \times \text{год})$	$0,39 \pm 0,04$	$0,14 \pm 0,04$ $p_1 < 0,01$	$0,46 \pm 0,38$
На 7 добу експерименту			
Лізис азоальбуміну, $E_{440}/(\text{мл} \times \text{год})$	$7,13 \pm 0,56$	$3,44 \pm 0,20$ $p_1 < 0,001$	$5,61 \pm 0,27$ $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,001$
Лізис азоказеїну, $E_{440}/(\text{мл} \times \text{год})$	$6,79 \pm 0,39$	$3,93 \pm 0,19$ $p_1 < 0,001$	$6,86 \pm 0,61$ $p_2 < 0,001$
Лізис азоколу, $E_{440}/(\text{мл} \times \text{год})$	$0,39 \pm 0,04$	$0,14 \pm 0,02$ $p_1 < 0,001$	$0,32 \pm 0,06$ $p_2 < 0,05$

Примітки в цій таблиці й усіх наступних:

1. ГНН – гостра ниркова недостатність.
2. p_1 – вірогідність відмінностей показників порівняно з контролем.
3. p_2 – вірогідність відмінностей показників порівняно з ГНН.

Таблиця 2 – Зміни протеолітичної активності плазми крові щурів при гліцероловій гострій нирковій недостатності після багаторазового введення корвітину ($M \pm m$, $n=7$)

Показники, які вивчали	Контроль	ГНН	ГНН+корвітин
		На 48 год експерименту	
Лізис азоальбуміну, $E_{440}/(\text{мл} \times \text{год})$	6,12 \pm 0,14	4,06 \pm 0,65 $p_1 < 0,01$	6,24 \pm 0,37 $p_2 < 0,05$
Лізис азоказеїну, $E_{440}/(\text{мл} \times \text{год})$	6,09 \pm 0,17	3,81 \pm 0,21 $p_1 < 0,001$	6,57 \pm 0,28 $p_2 < 0,001$
Лізис азоколу, $E_{440}/(\text{мл} \times \text{год})$	0,38 \pm 0,06	0,12 \pm 0,02 $p_1 < 0,01$	0,32 \pm 0,05 $p_2 < 0,01$
На 7 добу експерименту			
Лізис азоальбуміну, $E_{440}/(\text{мл} \times \text{год})$	6,12 \pm 0,14	2,72 \pm 0,13 $p_1 < 0,001$	5,69 \pm 0,32 $p_2 < 0,001$
Лізис азоказеїну, $E_{440}/(\text{мл} \times \text{год})$	6,09 \pm 0,17	3,56 \pm 0,17 $p_1 < 0,001$	6,28 \pm 0,21 $p_2 < 0,001$
Лізис азоколу, $E_{440}/(\text{мл} \times \text{год})$	0,38 \pm 0,06	0,14 \pm 0,02 $p_1 < 0,01$	0,28 \pm 0,09

Таблиця 3 – Зміни протеолітичної активності тканини нирок щурів при гліцероловій гострій нирковій недостатності після багаторазового введення корвітину ($M \pm m$, $n=7$)

Показники, які вивчали	Контроль	ГНН	ГНН+корвітин
		На 48 год експерименту	
Лізис азоальбуміну, $E_{440}/(\text{мл} \times \text{год})$	78,0 \pm 6,7	37,7 \pm 3,9 $p_1 < 0,001$	57,1 \pm 2,0 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,01$
Лізис азоказеїну, $E_{440}/(\text{мл} \times \text{год})$	79,7 \pm 6,3	50,6 \pm 2,4 $p_1 < 0,01$	66,2 \pm 1,5 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,001$
Лізис азоколу, $E_{440}/(\text{мл} \times \text{год})$	5,3 \pm 0,8	3,5 \pm 0,3 $p_1 < 0,05$	7,5 \pm 1,3 $p_2 < 0,01$
На 7 добу експерименту			
Лізис азоальбуміну, $E_{440}/(\text{мл} \times \text{год})$	78,0 \pm 6,7	40,1 \pm 3,3 $p_1 < 0,001$	57,4 \pm 3,2 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,01$
Лізис азоказеїну, $E_{440}/(\text{мл} \times \text{год})$	79,7 \pm 6,3	42,5 \pm 2,9 $p_1 < 0,001$	62,4 \pm 1,0 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,001$
Лізис азоколу, $E_{440}/(\text{мл} \times \text{год})$	5,3 \pm 0,8	2,1 \pm 0,3 $p_1 < 0,01$	6,8 \pm 0,4 $p_2 < 0,001$

1,3 та 1,5 раза відповідно. Інтенсивність розпаду азоколу також збільшувалась у лікованих тварин порівняно з нелікованими, що наведено в зазначеній вище таблиці: на 48 год – у 2,1 раза, на 7 добу – в 3,2 раза на тлі корвітину.

Отже, водорозчинний препарат кверцетину корвітин при тривалому використанні сприяв відновленню протеолітичної активності в організмі тварин з гліцероловою ГНН, що про-

являлось більшою мірою відновленням протеолізу білків.

ВИСНОВОК. Багаторазове застосування водорозчинного препарату кверцетину корвітину збільшує протеолітичну активність рідин організму і тканин нирок за умов ГНН, що дає підстави для проведення подальших клінічних досліджень.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Веремеенко К.Н. Протеолиз в норме и патологии / К.Н. Веремеенко, О.П. Голобородько, А.И. Кизим. – К. : Здоров'я, 1988. – 199 с.
2. Веремеенко К.Н. Роль протеолиза в инвазии и метастазировании злокачественных опухолей (обзор литературы и собственных исследований) / К.Н. Веремеенко, Д.И. Заболотный, А.И. Кизим // Журн. АМН України. – 2002. – 2. – С. 217-237.
3. Викторов И.В. Роль оксида азота и других свободных радикалов в ишемической патологии мозга / И.В. Викторов // Вестник РАМН. – 2000. – № 4. – С. 5-11.
4. Горошко О.М. Вплив препаратів кверцетину на фібринолітичні процеси в організмі лабораторних щурів за умов гострої ниркової недостатності / О.М. Горошко, І.І. Заморський // V Міжнародна медико-фармацевтична конференція студентів та молодих вчених. – Хист. – 2008. – Вип. 10. – Чернівці, 2008. – С. 201.
5. Зупанець І.А. Дослідження гострої токсичності та середньоєфективних доз кверцетину при парантеральному введенні в умовах розвитку ниркової недостатності у щурів / І.А. Зупанець, С.К. Шебеко, Д.С. Харченко // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2009. – № 1 (8). – С. 28-32.
6. Зупанець І.А. Дослідження ефективності корвітину при нирковій недостатності у щурів / І.А. Зупанець, С.К. Шебеко, Д.С. Харченко // Клінічна фармація в Україні : матеріали VII Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, Харків, 15-16 листоп. 2007 р., М-во охорони здоров'я України; Нац. фарм. ун-т. – Х., 2007. – С. 148-149.
7. Орлова Е.А. Протеолитическая активность ткани почек при стимуляции апоптоза на фоне введения даларгина / Е.А. Орлова // Укр. мед. альм. – 2002. – 5, № 6. – С. 106-108.
8. Орлова О.А. Динаміка протеолітичної активності в тканині нирок щурів за умов окиснювального стресу / О.А. Орлова // Укр. мед. альм. – 2002. – 5, № 5. – С. 98-99.
9. Chander V. Reversal of Experimental Myoglobimtrie Acute Renal Failure in Rats by Quercetin, a Bioflaeonaid / V. Chander, D. Singh, K. Chopra // Phamakologi. – 2004. – 2773, № 1. – P. 49-56.
10. Heidland A. Renal fibrosis: Role impaired proteolysis and potential therapevtic strategies / A. Heidland, K. Sebekova, L. Paczek // Kidney Int. – 1997. – 52. – P. 1-4.
11. Li P.F. Oxidative modification of bovine eritrocyte superoxide dismutase by hydrogen peroxide and ascorbate-Fe (III) / P.F. Li, Y.Z. Fang, X. Lu // Biochem. Mol. Biol. Int. – 1993. – 29, № 5. – P. 929-937.

А.М. Горошко, И.И. Заморский, О.В. Геруш, И.В. Геруш, И.М. Сахацкая
БУКОВИНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ЧЕРНОВЦЫ

ИЗМЕНЕНИЯ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПЛАЗМЫ КРОВИ, МОЧИ И ТКАНИ ПОЧЕК КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ОСТРОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ И ЕЁ КОРРЕКЦИЯ КОРВИТИНОМ

Резюме

В эксперименте на белых крысах изучено влияние корвитина на изменения протеолитической активности плазмы крови, мочи и ткани почек крыс при глицероловой острой почечной недостаточности, вызванной внутримышечным введением 50 % раствора глицерина, и проведено коррекцию корвитинном. Корвитин вводили внутрибрюшинно в дозе 8 мг/кг в течение 7 суток один раз в день. Доказано, что корвитин возобновляет протеолитический потенциал жидкостей организма (плазмы крови, мочи) и тканей почек животных.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: острая почечная недостаточность, корвитин, протеолитическая активность.

О.М. Horoshko, I.I. Zamorskyi, O.V. Herush, I.V. Herush, I.M. Sakhatska
BUKOVYNIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY, CHERNIVTSI

CHANGES OF THE PROTEOLYTIC POTENCY OF RATS' BLOOD PLASMA, IN CASE OF EXPERIMENTAL ACUTE RENAL FAILURE AND THEIR CORRECTION BY CORVITINE

Summary

The effect of corvistine on the changes of the proteolytic potency of blood plasma, urine and renal tissue on glycerol acute renal failure associated with intramuscular injection of 50 % glycerin solution and their correction have been experimentally studied in white rats. A single intraperitoneal injection of corvistine has been introduced during 7 days in dosage 8 mg/kg. The study has showed that corvistine renews the impaired proteolytic potency of body fluids (blood plasma, urine) and renal tissue in animals.

KEY WORDS: acute renal failure, corvitin, proteolytic activity.

Отримано 20.10.10

Адреса для листування: О.М. Горошко, вул. Кочубея, 40/14, Чернівці, 58003, Україна.

АКТИВНІСТЬ ТИРОЗИНОВИХ ПРОТЕЇНкіНАЗ ТА ФОСФАТАЗ У КЛІТИНАХ ПЕЧІНКИ, М'ЯЗОВОЇ ТА ЖИРОВОЇ ТКАНИН ЩУРІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 2 ТИПУ

Встановлено, що цукровий діабет 2 типу супроводжується порушеннями функціонування ферментів тирозинового фосфорилування та дефосфорилування у клітинах основних інсуліночутливих тканин. Показано значне зниження тирозинкіназної активності у плазматичних мембранах клітин усіх досліджуваних тканин. Встановлено підвищення протеїнтирозинфосфатазної активності у цитозолі й плазматичних мембранах клітин м'язової та жирової тканин.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: тирозинпротеїнкінази, тирозинпротеїнфосфатази, інсуліновий рецептор, цукровий діабет 2 типу.

ВСТУП. Цукровий діабет 2 типу (ЦД 2) – це захворювання ендокринної системи, яке характеризується порушенням усіх видів обміну речовин, перш за все вуглеводного [7]. Актуальність проблеми ЦД 2 зумовлена значною поширеністю захворювання, тим, що він є базою для розвитку складних супутніх захворювань та ускладнень, ранньої інвалідності та смертності.

Більшість дослідників дійшли висновку, що інсулінорезистентність є чи не найголовнішою причиною формування ЦД 2, і пошук етіологічних чинників, що її викликають, та розкриття механізмів розвитку даного стану є актуальним завданням сучасної медичної біохімії. У цьому відношенні найбільшу увагу наразі привертають до себе молекулярні та біохімічні механізми передачі гормонального сигналу від інсулінового рецептора, оскільки є всі підстави вважати, що саме різноманітні дефекти інсулінового сигнального каскаду відіграють важливу роль у розвитку інсулінової резистентності [8].

Інсулінорезистентність – це недостатня відповідь клітин на дію інсуліну при його достатній кількості в крові. Свою біологічну дію на рівні клітини інсулін проявляє через відповідний рецептор. Інсуліновий рецептор (ІР) – це складний глікопротеїн, який складається з двох α - та двох β -субодиниць, сполучених дисульфідними зв'язками [6]. Приєднання молекули інсуліну до центру зв'язування α -субодиниці призводить до активації тирозинкіна-

зи та автофосфорилування β -субодиниці рецептора інсуліну по декількох тирозिनних залишках. Як результат змінюється субстратна специфічність ферменту і він набуває здатності фосфорилувати певні внутрішньоклітинні месенджерні білки (субстрати інсулінового рецептора) й таким чином індукувати наступні ланки внутрішньоклітинної сигнальної трансдукції [9]. Метаболічні функції, що їх контролюють індуковані інсуліном вторинні месенджери, включають утворення та утилізацію глюкози, зберігання та мобілізацію ліпідів, секрецію різних клітинних продуктів метаболізму тощо [4].

Встановлено, що в регуляції сигнального каскаду від інсулінового рецептора беруть участь тирозинові протеїнфосфатази (ТПФ-ази) [1]. ТПФ-ази є гетерогенною родиною мембранозв'язаних та цитозольних ферментів, що здійснюють дефосфорилування специфічних сайтів у білках-мішенях, модулюючи їх залучення до сигнальних подій. У сучасній літературі дискусійним є питання щодо участі ТПФ-аз у регуляції активності ІР та їх можливої причетності до розвитку стану інсулінорезистентності.

Метою даної роботи було визначення активності мембранозв'язаних і внутрішньоклітинних тирозинових протеїнкіназ та фосфатаз у клітинах печінки, м'язової та жирової тканин щурів за умов експериментального ЦД 2.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди проводили на білих нелінійних щурах обох статей. Експериментальний ЦД 2 викликали одноразо-

© Т.І. Галенова, О.В. Богданова, О.М. Савчук, Л.І. Остапченко, 2010.

вим внутрішньочеревним введенням новонародженим 1-2-добовим щурят розчину стрептозоточину (Sigma, США) з розрахунку 80 мг на 1 кг маси тіла [3]. Контрольну групу складали щури, яким у тому ж віці внутрішньочеревно вводили 10 мМ цитратний буфер (рН 4,5), який використовували для розведення стрептозоточину.

Через 180 діб у піддослідних тварин визначали концентрацію глюкози в крові натще, яку встановлювали за допомогою глюкометра "ГЛЮКОФОР-II" (Україна) згідно з інструкцією. Для підтвердження розвитку стану інсулінорезистентності в щурів визначали чутливість периферичних тканин до інсуліну за допомогою інсуліно-глюкозотолерантного тесту [11], проведеного з власними модифікаціями.

Перед проведенням тесту натще тварини були анестезовані за допомогою інтраперитонеальної ін'єкції тіопенталу натрію у дозі 40 мг/кг. Визначали базальний рівень глюкози у крові, після чого щурам внутрішньовенно вводили розчин глюкози у загальному об'ємі 0,2 мл із розрахунку 0,7 г на 1 кг маси тварини та розчин інсуліну ("Монодар", Україна) з розрахунку 0,175 U на 1 кг маси тварини. За допомогою внутрішньовенного катетера через 2, 4, 6, 8, 10, 20 та 30 хв після введення інсуліну відбирали проби крові в об'ємі 100 мкл та визначали концентрацію глюкози. За результатами тесту будували глікемічну криву.

Тирозинпротейніназу (ТПК-азну) та тирозинпротейніфосфатазу (ТПФ-азну) активність визначали методом імуноферментного аналізу з використанням наборів реактивів (Sigma, США). Активність ферментів досліджували у фракціях плазматичних мембран та цитозолі клітин печінки, м'язової та жирової тканин

щурів, які отримували методом диференційного центрифугування, як запропоновано в роботі [2].

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою комп'ютерної програми "MS Excel XP".

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. У ході досліджень нами показано, що у піддослідних тварин розвиток експериментального стрептозоточиніндукованого ЦД 2 супроводжувався появою гіперглікемії натще. Так, у групі щурів з моделлю ЦД 2 спостерігалось зростання концентрації глюкози в крові в 1,5 раза порівняно зі значеннями контрольної групи (рис. 1, А).

За результатами інсуліно-глюкозотолерантного тесту були побудовані глікемічні криві, які відображають, наскільки швидко нормалізується рівень глюкози в крові у відповідь на екзогенний інсулін у групі контрольних тварин та щурів з моделлю ЦД 2. Для кількісного обчислення результатів, отриманих у ході інсуліно-глюкозотолерантного тесту, за індекс чутливості периферичних тканин до інсуліну брали швидкість зниження глюкози в крові після введення інсуліну, яку визначали за зміною показників концентрації глюкози на 2 і 10 хвилини від моменту введення інсуліну.

На основі аналізу отриманих даних встановлено зниження швидкості засвоєння глюкози периферичними тканинами у тварин з експериментальним ЦД 2 майже в 1,5 раза порівняно з контрольною групою (рис. 1, Б). Одержані результати можуть підтверджувати розвиток інсулінорезистентності у групі піддослідних тварин з моделлю ЦД 2. Однією з можливих причин розвитку даного патологічного стану є порушення внутрішньоклітинної сигналізації у клітинах інсуліночутливих тканин.

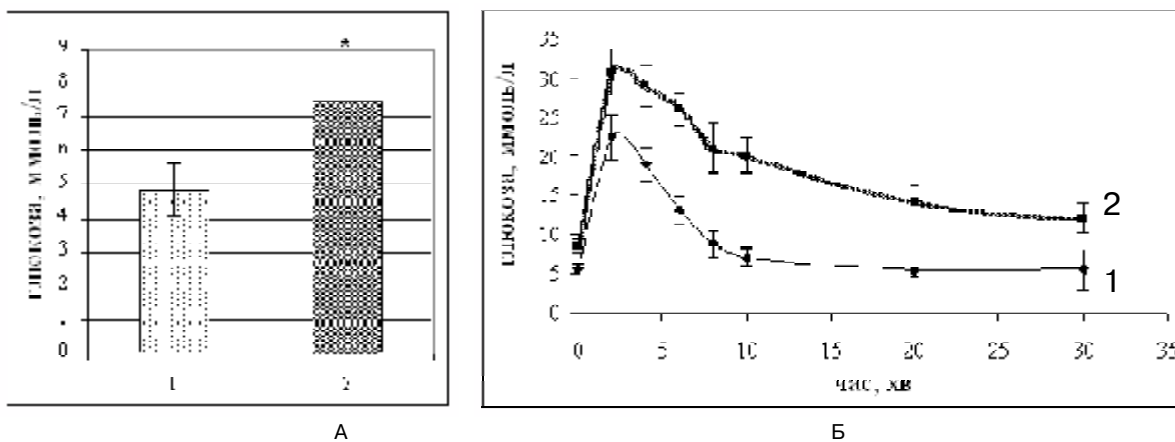


Рис. 1. Концентрація глюкози в крові натще (А) та глікемічні криві, отримані у ході інсуліно-глюкозотолерантного тесту (Б): 1 – у групі контрольних тварин; 2 – у щурів з експериментальною моделлю ЦД 2 типу. Примітка. * – $p < 0,05$ порівняно з даними контрольної групи.

Система тирозинового фосфорилування–дефосфорилування білків є важливою ланкою регуляції всіх внутрішньоклітинних процесів. Тирозинові протеїнкінази (ТПК-ази, КФ 2.7.1.112) відіграють ключову роль у регуляції клітинної проліферації, диференціації, метаболізмі та апоптозі у відповідь на внутрішні й зовнішні стимули. Функціональна активність ТПК-аз регулюється механізмом зворотного фосфорилування з участю тирозинових протеїнофосфатаз (ТПФ-аз, КФ 3.1.3.48). Порушення балансу між активністю ТПК-аз та ТПФ-аз може призводити до розвитку багатьох захворювань та патологічних станів організму.

Для з'ясування участі ферментів тирозинового фосфорилування в патогенезі ЦД 2 було досліджено ТПК-азну активність у фракціях плазматичних мембран і цитозолі клітин основних інсуліночутливих тканин щурів за умов експериментальної моделі ЦД. Встановлено, що розвиток ЦД 2 супроводжувався зниженням активності мембранозв'язаних ТПК-аз на 25 % у клітинах печінки, на 39 % у клітинах м'язової тканини та на 19 % у клітинах жирової тканини порівняно з контролем, тоді як у цитозольних фракціях їх активність за умов досліджуваної патології залишалася в межах контрольних значень (табл. 1).

Таблиця 1 – **Базальна тирозинпротеїнкіназна активність пмоль Фн/(хв·мг білка) в інсулінозалежних тканинах щурів за умов експериментальної моделі цукрового діабету 2 типу (M±m, n=8)**

Джерело ферментативної активності		Група спостереження	
		контроль	ЦД 2
печінка	плазматичні мембрани	81,22±4,06	61,21±3,06*
	цитозоль	210,33±10,52	186,71±9,34
м'язова тканина	плазматичні мембрани	132,09±6,60	53,62±2,68*
	цитозоль	56,63±2,83	41,49±2,07
жирова тканина	плазматичні мембрани	428,87±21,44	348,32±17,42*
	цитозоль	303,48±15,17	273,04±13,65

Примітка. * – $p \leq 0,05$ порівняно з даними контрольної групи.

Такі зміни активності мембранозв'язаних ТПК-аз можна пояснити з огляду на те, що плазматичні мембрани інсуліночутливих тканин у своєму складі містять значну кількість рецепторів до інсуліну. Інсуліновий рецептор має сайт, який є тирозиновою протеїнкіназою, що каталізує фосфорилування тирозинових залишків у білках-мішенях [6]. З літературних джерел відомо, що за нормальних умов тирозинкіназна активність у клітинах інсулінозалежних тканин зростає пропорційно до рівня глюкози в діапазоні фізіологічної концентрації інсуліну в крові [5], тоді як при досліджуваній патології спостерігається порушення проведення гормонального сигналу від інсулінового рецептора, що може бути наслідком неадекватної відповіді (неповної активації) рецептора на дію відповідного ліганду.

На сьогоднішні причини зниження тирозинкіназної активності інсулінового рецептора при розвитку експериментального ЦД вивчено недостатньо. Причин є декілька: за патологічних умов може зменшуватися кількість інсулінових рецепторів на поверхні клітини, можливі різноманітні порушення їх інтерналізації, можуть змінюватися структура та функціональний стан самого ферменту [5].

Для того, щоб з'ясувати, чи змінюється чутливість ІР до інсуліну, було досліджено ТПК-азну активність мембранних фракцій інсуліночутливих тканин за присутності відповідного гормону. Встановлено, що мембранозв'язана ТПК-азна активність за присутності інсуліну в групі контрольних тварин зростала на 43, 57 та 29 % відповідно у клітинах печінки, м'язової та жирової тканин порівняно з базальними значеннями ТПК-азної активності (рис. 2). У групі піддослідних щурів з моделлю ЦД 2 не було відмічено достовірного підвищення активності мембранозв'язаних ТПК-аз у відповідь на зв'язування інсуліну.

Отримані результати підтверджують думку про те, що за умов досліджуваної патології ІР втрачає здатність повною мірою активуватися на дію гормону. Проте причини, які призводять до порушення функціонування ІР на сьогодні залишаються не до кінця з'ясованими.

Гетерогенною групою трансмембранних та цитозольних ферментів, що здійснюють дефосфорилування молекул-мішеней, змінюючи конформацію і таким чином припиняючи їх дію або потенціюючи їх активність, є тирозинові протеїнофосфатази. Зміна активності ТПФ-аз може бути причетною до розвитку багатьох

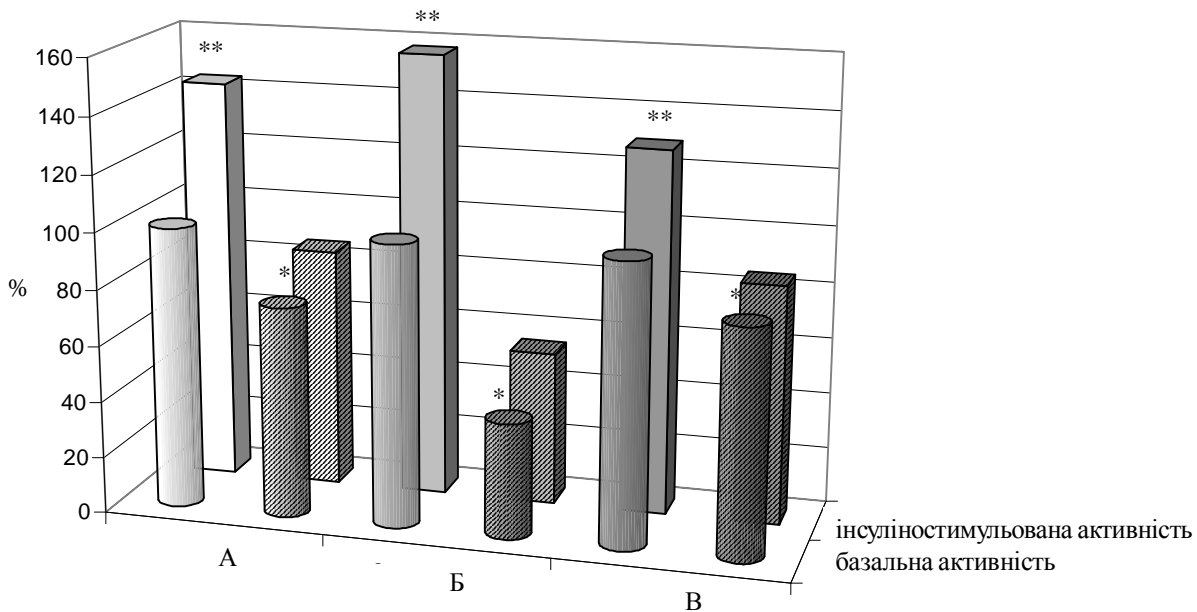


Рис. 2. Вплив інсуліну на тирозинкіназу активність у плазматичних мембранах клітин печінки (А), м'язової (Б) та жирової (В) тканин шурів за умов експериментальної моделі цукрового діабету 2 типу (▨).

Примітка. * – $p \leq 0,05$ порівняно з базальними значеннями контрольної групи; ** – $p \leq 0,05$ порівняно зі значеннями контрольної групи за відсутності активатора.

захворювань і патологічних порушень різних систем та органів. Відомо кілька ТПФ-аз у клітинах інсуліночутливих тканин, залучених до негативної регуляції ІР: рецепторні ТПФ-ази LAR (leukocyte antigen-related) і (LRP)/RPTPa (leukocyte common antigen-related phosphatase) та цитозольна ТПФ-аза РТР1В, тоді як цитозольна ТПФ-аза SH-РТР2 є позитивним медіатором сигнального каскаду [1].

З метою визначення функціонального стану ферментів дефосфорилування за умов ЦД 2 було досліджено ТПФ-азну активність у фракціях плазматичних мембран і цитозолі клітин основних інсуліночутливих тканин.

У результаті досліджень показано, що розвиток експериментального ЦД 2 супроводжувався підвищенням ТПФ-азної активності в досліджуваних фракціях клітин м'язової та жирової тканин. Встановлено, що за умов експериментального ЦД 2 у фракціях плазматичних мембран клітин м'язової та жирової тканин ТПФ-азна активність зростала в 1,8 і 2 рази відповідно (рис. 3, А). Менш виражене підвищення ТПФ-азної активності було відмічено для препаратів цитозолу клітин м'язової та жирової тканин – у 1,2 та 1,5 рази відповідно (рис. 3, Б). В усіх досліджуваних фракціях клітин печінки за умов експериментального ЦД 2 ак-

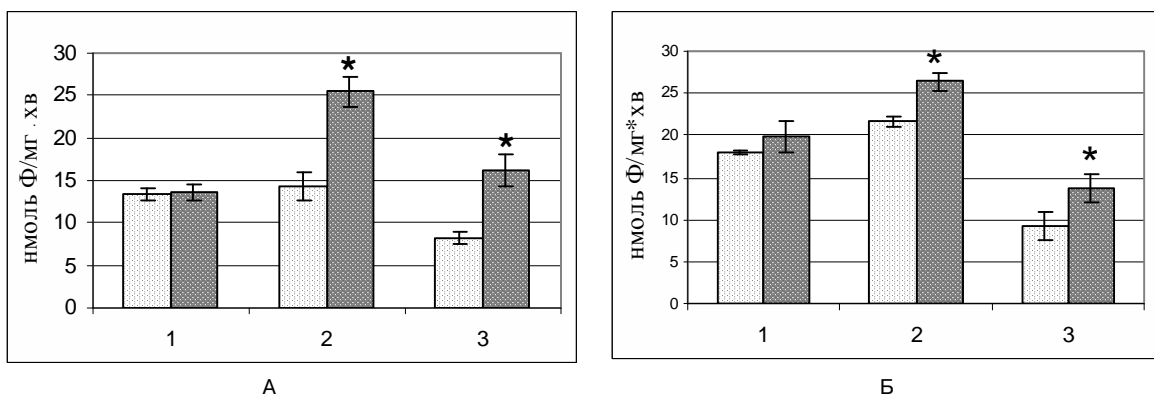


Рис. 3. Тирозинпротеїнофосфатазна активність у плазматичних мембранах (А) і цитозолі (Б) клітин печінки (1), м'язової (2) та жирової (3) тканин шурів у контролі (□) та за умов експериментальної моделі цукрового діабету 2 типу (▨).

Примітка. * – $p \leq 0,05$ порівняно з даними контрольної групи.

тивність ТПФ-аз залишалася на рівні контрольних значень.

Зростання активності мембранозв'язаних ТПФ-аз може бути причиною підвищеного дефосфорилування IP і тим самим негативно позначатися на проведенні гормонального сигналу всередину клітини. Ця думка узгоджується з даними літератури про те, що підвищення експресії рецепторної ТПФ-ази LAR у 2,5 раза у клітинах скелетних м'язів мишей супроводжується розвитком стану інсулінорезистентності та порушенням утилізації глюкози [10]. Відомо, що цитозольні ТПФ-ази, зокрема PTP1B, дефосфорилують субстрати інсулінового рецептора та окремі компоненти сигнального каскаду. А отже, підвищення активності цитозольних ТПФ-аз може супроводжуватися порушенням внутрішньоклітинної сигнальної трансдукції та, як наслідок, бути причиною розвитку стану інсулінорезистентності.

ВИСНОВКИ. Отримані результати свідчать про зниження базальної активності мембранозв'язаних та цитозольних ТПК-аз клітин печінки, м'язової та жирової тканин, що може вказувати на порушення сигнальної транс-

дукції за умов експериментального ЦД 2. Результати дослідження ТПК-азної активності за присутності інсуліну дозволяють зробити висновки, що при досліджуваній патології інсуліночутливі мембранозв'язані ТПК-ази втрачають здатність реагувати на інсулін, що, власне, може бути причиною порушення внутрішньоклітинної передачі гормонального сигналу.

Результати дослідження функціонального стану ферментів дефосфорилування свідчать про значну активацію мембранозв'язаних та, меншою мірою, цитозольних ТПФ-аз клітин м'язової та жирової тканин за умов експериментального ЦД 2. Зростання ТПФ-азної активності може бути причиною посилення дефосфорилування інсулінового рецептора та інших білків сигнального каскаду, що, у свою чергу, може призвести до порушень у проведенні гормонального сигналу від інсулінового рецептора та розвитку периферійної інсулінорезистентності. Відсутність змін ТПФ-азної активності у клітинах печінки може вказувати на різні механізми розвитку інсулінорезистентного стану в клітинах жирової і м'язової тканин та клітинах печінки.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Goldstein B.J. Protein-Tyrosine Phosphatases: Emerging Targets for Therapeutic Intervention in Type 2 Diabetes and Related States of Insulin Resistance // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2002. – **87**, № 6. – P. 2474–2480.
2. Hauguel de Mouzon S., Peraldi P., Alengrin F., Van Obberhen E. Alteration of phosphotyrosinophosphatase activity in tissues from diabetic and pregnant rats // *Endocrinol.* – 1993. – **132**. – P. 67–74.
3. Hemmings S.J., Spafford D. Neonatal STZ model of type II diabetes mellitus in the Fischer 344 rat: characteristics and assessment of the status of the hepatic adrenergic receptors // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2000. – **32**. – P. 905–919.
4. Kido Y., Nakae J., Accili D. The Insulin Receptor and Its Cellular Targets // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2001. – **86**, № 3. – P. 972–979.
5. Olefsky J.M. The Insulin Receptor // *Diabetes.* – 1990. – **39**. – P. 1009–1016.
6. Perz M., Torlinska T. Insulin receptor – structural and functional characteristics // *Med. Sci. Monit.* – 2001. – **7**, № 1. – P. 169–177.
7. Thevenod F. Pathophysiology of Diabetes Mellitus Type 2: Roles of Obesity, Insulin Resistance and β -Cell Dysfunction // *Diabetes and Cancer.* – 2008. – **19**. – P. 1–18.
8. Virkamaki A., Ueki K., Kahn C.R. Protein–protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance // *J. Clin. Invest.* – 1999. – **103**, № 7. – P. 931–943.
9. Whites M.F., Kahn C.R. The Insulin Signaling System // *J. Biol. Chem.* – 1994. – **269**, № 1. – P. 1–4.
10. Zabolotny J.M., Kim Y.B., Peroni O.D. et al. Overexpression of the LAR (leukocyte antigen-related) protein-tyrosine phosphatase in muscle causes insulin resistance // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2001. – **98**. – P. 5187–5192.
11. Zhang F., Ye C., Li G. et al. The rat model of type 2 diabetic mellitus and its glycometabolism characters // *Exp. Anim.* – 2003. – **52**, № 5. – P. 401–407.

АКТИВНОСТЬ ТИРОЗИНОВЫХ ПРОТЕИНКИНАЗ И ФОСФАТАЗ В КЛЕТКАХ ПЕЧЕНИ, МИШЕЧНОЙ И ЖИРОВОЙ ТКАНЕЙ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА

Резюме

Установлено, что сахарный диабет 2 типа сопровождается нарушениями функционирования ферментов тирозинового фосфорилирования и дефосфорилирования в клетках основных инсулинозависимых тканей. Показано значительное снижение тирозинкиназной активности в плазматических мембранах клеток всех исследуемых тканей. Установлено повышение протеинтирозинфосфатазной активности в цитозоли и плазматических мембранах клеток мышечной и жировой тканей.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: тирозинпротеинкиназы, тирозинпротеинфосфатазы, инсулиновый рецептор, сахарный диабет 2 типа.

T.I. Halenova, O.V. Bohdanova, O.M. Savchuk, L.I. Ostapchenko
TARAS SHEVCHENKO KYIV NATIONAL UNIVERSITY

PROTEIN TYROSINE KINASES AND PHOSPHATASES ACTIVITY LIVER, MUSCLE AND ADIPOSE CELLS OF RATS UNDER TYPE 2 DIABETES MELLITUS

Summary

It has been established that type 2 diabetes mellitus is accompanied by significant abnormalities of the functioning of tyrosine phosphorylation and dephosphorylation enzymes in cells of main insulin sensitive tissues. A significant decrease protein tyrosine kinase activities in plasma membranes of all studied tissues cells has been shown. It has been proved that protein tyrosine phosphatase activities in plasma membranes and cytosol of muscle and adipose cells have been significantly increased.

KEY WORDS: protein tyrosine kinases, protein tyrosine phosphatases, insulin reseptor, type 2 diabetes mellitus.

Отримано 19.10.10

Адреса для листування: Т.І. Галенова, вул. Наумова генерала, 23, кв. 172, Київ, 03164, Україна.

**КЛАСТЕРОУТВОРЕННЯ ВОДИ В ЛІОФІЛІЗОВАНОМУ ГОМОГЕНАТІ
ТКАНИНИ ПЕЧІНКИ ІНТАКТНИХ ТА ЩУРІВ З КАРЦИНОМОЮ ГЕРЕНА**

Методом ¹H ЯМР спектроскопії при низьких температурах проведено порівняльне дослідження стану води в ліофілізованій тканині печінки інтактних щурів і щурів із трансплантованою карциномою Герена. Підібрано співвідношення концентрацій полярних і неполярних органічних розчинників, при яких спостерігається істотна різниця кластерної структури води в інтактних клітинах і патологічно змінених.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: міжфазна межа, зв'язана вода, кластерні утвори, карцинома Герена.

ВСТУП. Незважаючи на значні успіхи, досягнуті за останні роки в діагностиці та лікуванні багатьох видів онкологічних захворювань, пошук нових маркерів та мішеней пухлин на основі структурних змін клітини залишається актуальним завданням експериментальної та клінічної медицини. Відомо, що пухлинні клітини характеризуються неконтрольованою проліферацією, порушеним диференціюванням і клітинним атипізмом. Основні зміни відносять до порушення структури цитоскелета, клітинного метаболізму і систем каскаду сигнальної трансдукції, що управляють процесом клітинного поділу. Як наслідок зміни виявляють не тільки на клітинному рівні, але й на рівні тканин та органів пухлиноносія [6-8].

Оскільки клітини характеризуються мікронними розмірами, внутрішньоклітинне середовище слід розглядати як нанорозмірну систему, в якій структурні елементи клітин оточені внутрішньоклітинною рідиною, що є багатокомпонентним розчином органічних і неорганічних речовин. Звична структура внутрішньоклітинної води, що визначається формуванням сітки водневих зв'язків, близька до структури рідкої води, про що свідчить близьке значення ЯМР хімічних зсувів об'ємної і внутрішньоклітинної води [2, 3]. Детальні дослідження показали, що в клітинах, як і в рідкій воді, в довільний момент часу кожна молекула води утворює в середньому приблизно 2,5 водне-

вих зв'язків [11]. Велика кількість такої об'ємної води не дозволяє оцінити вплив внутрішньоклітинних міжфазних меж на структуру шару води, яка перебуває в контакті з ним. Однак при глибокій дегідратації клітин методом їх ліофільного сушіння об'ємна вода під впливом кріопротекторів проникає через клітинну мембрану, вимерзає і видаляється шляхом сублімації. В клітинах залишається зв'язана вода, яка виповнює нанорозмірні порожнини, утворені структурними елементами клітин. Можна вважати, що така вода перебуває в кластерному стані, оскільки число молекул води в кожній порожнині відносно невелике. Питання про кластерний стан води активно обговорюється в літературі [9, 16, 17]. Властивості водно-органічних систем у кластерному стані можуть суттєво відрізнятись від об'ємних. Зокрема показано, що за певних умов значна частина внутрішньоклітинної води переходить у незвичайну, слабоасоційовану форму, в якій вона утворює невелике число водневих зв'язків [4, 14].

Метою даної роботи було порівняльне дослідження стану води в ліофілізованих клітинах печінки інтактних і щурів з перещепленою (трансплантованою) карциномою Герена (зразки *Int* і *Canc* відповідно), визначення її внутрішньоклітинних термодинамічних і гідратаційних параметрів під впливом органічних розчинників та їх сумішей.

Як основний метод дослідження було вибрано низькотемпературну ¹H ЯМР спектроско-

пю, з використанням якої за величиною хімічного зсуву можна визначити середнє координаційне число води, а за температурною залежністю інтенсивності сигналу незамерзаючої води в процесі заморожування–відтавання – зміну вільної енергії Гіббса, зумовлену взаємодією з внутрішньоклітинними міжфазними межами. Детальний опис методу виморожування рідкої фази наведено у низці оглядових статей [10, 15].

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Тканину печінки було отримано від щурів лінії Вістар (інтактні щури і щури з трансплантованою карциномою Герена масою по 180 г). Для експериментів брали по 5 г печінки і поміщали у фосфатний буфер (40 мл), після чого проводили гомогенізацію матеріалу. Потім тканину висушували, використовуючи метод ліофільного сушіння. Після висушування маса печінки інтактних щурів (*Int*) складала 1,256 г, а печінки щурів з карциномою Герена (*Canc*) – 1,132 г. Фотографії зразків, отримані на фазово-контрастному мікроскопі (MIKMED 2, LOMO, Russia, збільшення $\times 400$), наведено на рисунку 1. Добре видно, що в тканині печінки з пухлинним процесом значно збільшена кількість мембранних міхурців розміром 1-1,5 мкм (лізосоми та пероксисоми), що може свідчити про підвищену метаболічну активність.

Залишковий вміст води, який визначали за інтенсивністю сигналу води в спектрах ^1H ЯМР, складав менше 2 % мас. Ліофілізат поміщали в стандартну 5-міліметрову ампулу ЯМР і додавали 10-20 % дистильованої води. Зразок врівноважували при безперервному струшуванні протягом 10 хв за кімнатної температури і залишали в ампулі на 1-2 год. Дані зразки використовували як первинні для проведення експериментів з водно-органічними сумішами. Для цього до зразка, що містить необхідну кількість води, додавали необхідну кількість дейтерованого органічного розчинника (CDCl_3 , CD_3CN , $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) або їх суміші у певному співвідношенні. Застосування дейтерованих препаратів зумовлене намаганням виключити сигнали протонів органічного розчинника, інтенсивність якого могла бути значно більшою, ніж сигналу внутрішньоклітинної води.

^1H ЯМР спектроскопія. Спектри ^1H ЯМР отримували на ЯМР-спектрометрі високої роздільної здатності “Varian 400 Mercury” з робочою частотою 400 МГц. Температуру (200-280 К) в датчиках спектрометра регулювали термоприставкою “Bruker VT-1000” з точністю ± 1 град.

Інтенсивність сигналів визначали електронним інтегратором з точністю ± 10 %. Для запобігання переохолодженню суспензій спектри ^1H ЯМР незамерзаючої води проводили при нагріванні зразків, заздалегідь охолоджених до температури 210 К.

Спосіб визначення характеристик міжфазних шарів води за допомогою ^1H ЯМР спектроскопії детально викладено в [10, 15]. Він базується на впливі міжфазної межі на температуру фазового переходу вода–лід. Завдяки адсорбційним взаємодіям температура замерзання міжфазної води знижена. Оскільки вільна енергія льоду зі зниженням температури змінюється за лінійним законом [1], зміна вільної енергії Гіббса і температури фазового переходу ($273 - T$) пов'язана співвідношенням:

$$DG = -0,036(273 - T) \quad (1)$$

Площа, обмежена графіком залежності $DG(C_{uw})$, визначає величину зміни міжфазної енергії (g_s), яка дорівнює сумарному зниженню вільної енергії води, що зумовлене присутністю межі розділу фаз:

$$g_s = A \int_0^{C_{uw}^{\max}} \Delta G(C_{uw}) dC_{uw}$$

В цьому виразі C_{uw}^{\max} – товщина шару незамерзаючої води при $T \rightarrow 273$ К.

На кривій графіка $DG(C_{uw})$ можуть бути виділені ділянки, які відносять до слабо- і сильнозв'язаної води. Слабозв'язана відповідає тій частині води, яка не замерзає при $250 < T < 273$ К і вільна енергія якої незначно знижена в результаті адсорбційних взаємодій з поверхнею адсорбентів або біополімерів. Сильнозв'язана вода не замерзає навіть при сильному охолодженні суспензії [15]. Кількісні (C_{uw}^s і C_{uw}^w для сильно- і слабозв'язаної води відповідно) й енергетичні (DG^s і DG^w) характеристики шарів зв'язаної води можуть бути отримані шляхом екстраполяції відповідних ділянок кривої на графіку $DG(C_{uw})$ до осей координат. За здатністю молекул міжфазної води утворювати водневі зв'язки зі своїми сусідами вона поділяється на сильно- ($\delta_H \sim 3 \dots 5$ м. д.) і слабоасоційовану ($\delta_H \sim 1 \dots 2$ м. д.). У випадку, коли процес переходу води у слабоасоційований стан енергетично вигідний, слабоасоційована вода є сильнозв'язаною і замерзає при дуже низькій температурі. Якщо ж формування шару слабоасоційованої води визначається ентропійним чинником, то слабоасоційована вода може бути слабозв'язаною.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. На рисунку 2, *a-e* наведено спектри ^1H ЯМР води зразків *Int* (*a, в, д*) і *Canc* (*б, г, е*), зняті при різних температурах в діапазоні 210-280 К. Спектри обох зразків містять одиничний, дещо асиметричний, широкий сигнал, максимум якого має хімічний зсув 5 м.д., що збігається з хімічним зсувом рідкої води. Зі зниженням температури інтенсивність сигналу зменшується внаслідок часткового замерзання зв'язаної води. Вигляд спектра різко змінюється при перенесенні зразків у середовище дейтерохлороформу (рис. 2, *б, в*). У спектрах з'являється ряд сигналів з хімічними зсувами в діапазоні 0-7 м.д. Сигнали з хімічними зсувами $d \sim 7,2$ м.д. і 0 м.д. належать до СН-груп недейтерованої частини хлороформу і CH_3 -груп тетраметилсилану, присутнього в хлороформі як стандарт. Інші сигнали слід відносити до різних форм міжфазної води. При цьому, відповідно до класифікації, що наведена в [10], якщо хімічний зсув протонів у молекулах води перебуває в діапазоні 3-6 м.д., то вода є сильноасоційованою, а менше 3 м.д. – слабоасоційованою, тобто такою, в якій кожна молекула води бере участь у формуванні не більше одного водневого зв'язку.

Як видно з даних, наведених на рисунку 2, *б, в*, у спектрах обох зразків окремо реєструються 2-3 сигнали сильноасоційованої і 3-5 сигналів слабоасоційованої води. Тобто середовище слабополярного хлороформу справляє диференціюючий вплив на воду, зв'язану структурними елементами клітинного гомогенізату. Різні форми зв'язаної води можуть стабілізуватися в нанорозмірних порожнинах, утворених міжфазними межами, з різними гідрофільно-ліпофільними властивостями [12].

Різниця між станом води в зразках *Int* і *Canc* полягає в тому, що для зразка *Canc* співвідношення інтенсивностей сигналів сильно- і слабоасоційованої води зсувається в сторону її слабоасоційованих форм. У роботах [5, 12] було показано, що в нанопористих тілах із слабогідрофільною поверхнею зміна стану адсорбованої води за присутності слабополярних органічних розчинників зумовлена здатністю їх молекул заміщувати воду в пристінковому шарі. Це викликано більшою (порівняно з водою) енергією взаємодії за дисперсійним механізмом для об'ємних органічних молекул.

Зі зростанням концентрації зв'язаної води до 20 % мас. (рис. 2, *д, е*) в обох зразках співвідношення інтенсивностей сигналів змінюється в сторону збільшення внеску від сигналу сильноасоційованої води (інтенсивність сигналу слабоасоційованої води залишається практично без змін). Таким чином, диференціюючий вплив хлороформу проявляється у відносно вузькому діапазоні співвідношення концентрацій вода/хлороформ.

Хоча середовище дейтерохлороформу і дозволяє визначити відмінність у стані зв'язаної води в ліофілізатах тканин інтактної печінки та з карциномою Герена, детальне віднесення сигналів на рисунку 2, *в, г* не є можливим, оскільки досліджувані матеріали являють собою складні багатокомпонентні системи і на даний час не можуть бути охарактеризовані. Тому серед доступних для вивчення дейтерованих органічних розчинників та їх сумішей було здійснено пошук систем, що справляють різний диференціюючий вплив на зв'язану воду у вибраних зразках. Отримані системи

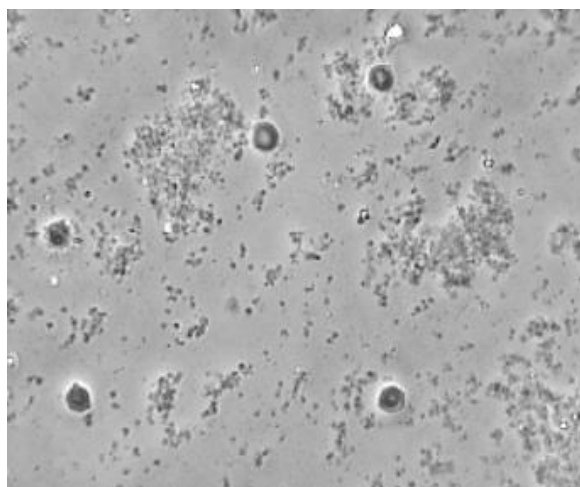
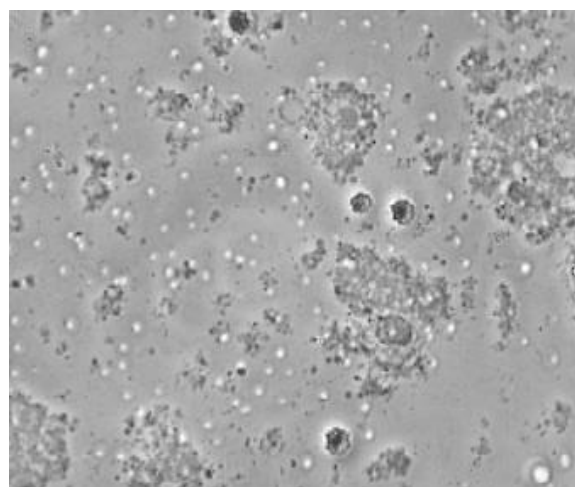
*a**б*

Рис. 1. Фотографії гомогенізаторів інтактної (*a*) та ураженої карциномою (*б*) печінки щурів.

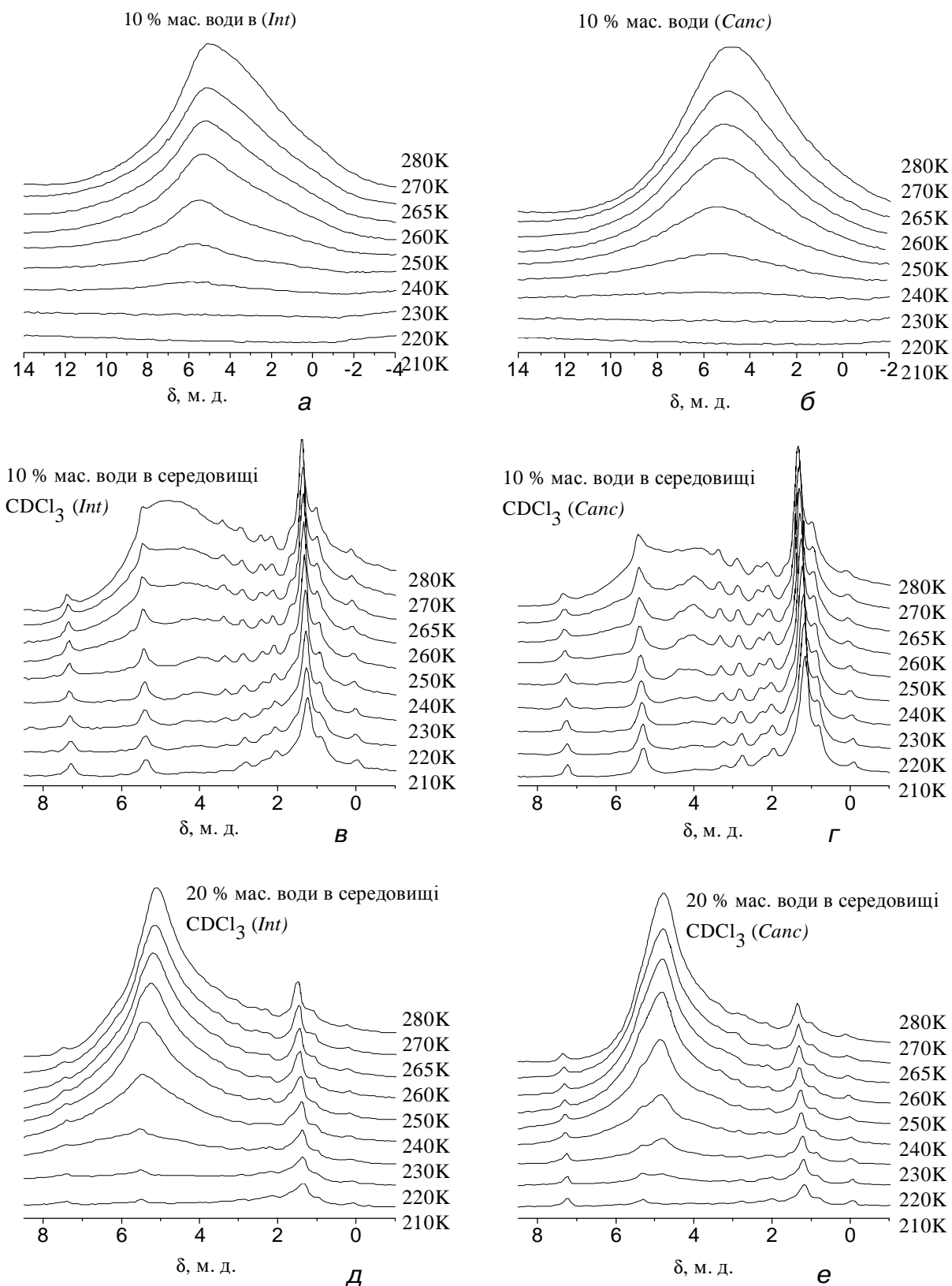


Рис. 2. Спектри внутрішньоклітинної води в тканині печінки інтактних шурів (а, в, д) і шурів із трансплантованою карциномою Герена, які містять 10 % мас. води (а, б); 10 % мас. води в середовищі CDCl_3 (в, г); 20 % мас. води в середовищі CDCl_3 (д, е).

оптимізувались за вмістом води і концентраціями компонентів. З'ясовано, що найкращий результат може бути отриманий для сумішей $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{CN}$ і $\text{CDCl}_3/(\text{CD}_3)_2\text{SO}$.

На рисунку 3 наведено зняті при різних температурах спектри води в таких оптимізованих системах (співвідношення концентрацій компонентів вказано на рисунку). Якщо до наноструктурованої системи, яка складається з клітинного гомогенізату, адсорбованої води і хлороформу, додати водорозчинні електронодонорні розчинники (ацетонітрил, ДМСО), то їх молекули можуть або заміщувати воду в структурованих межах розділу фаз нанокластерах води, або формувати на міжфазній межі нову кластерну систему вода–електронодонор. Це можливо, оскільки вибрані електро-

нодонори необмежено розчинні у хлороформі, а крім того, в хлороформі розчинні водневозв'язані комплекси $\text{HOH}\dots\text{NCCD}_3$ (або $\text{HOH}\dots\text{OS}(\text{CD}_3)_2$). Протони води в таких комплексах мають хімічний зсув $d \sim 3,5$ м.д.

Як видно з рисунка 3, порівняно із середовищем чистого хлороформу вигляд спектрів істотно спрощується. В спектрах реєструються три основних сигнали: сигнал сильноасоційованої води з хімічним зсувом $d \sim 5$ м.д., сигнал слабоасоційованої води з хімічним зсувом $d \sim 1$ м.д. і сигнал водневозв'язаних комплексів вода–електронодонор з хімічним зсувом $d \sim 3,5$ м.д.

На рисунку 3, а-в усі сигнали спостерігаються окремо, що свідчить про повільний (у шкалі часу ЯМР) молекулярний обмін [13] між молекулами води, яка відповідає за ці сиг-

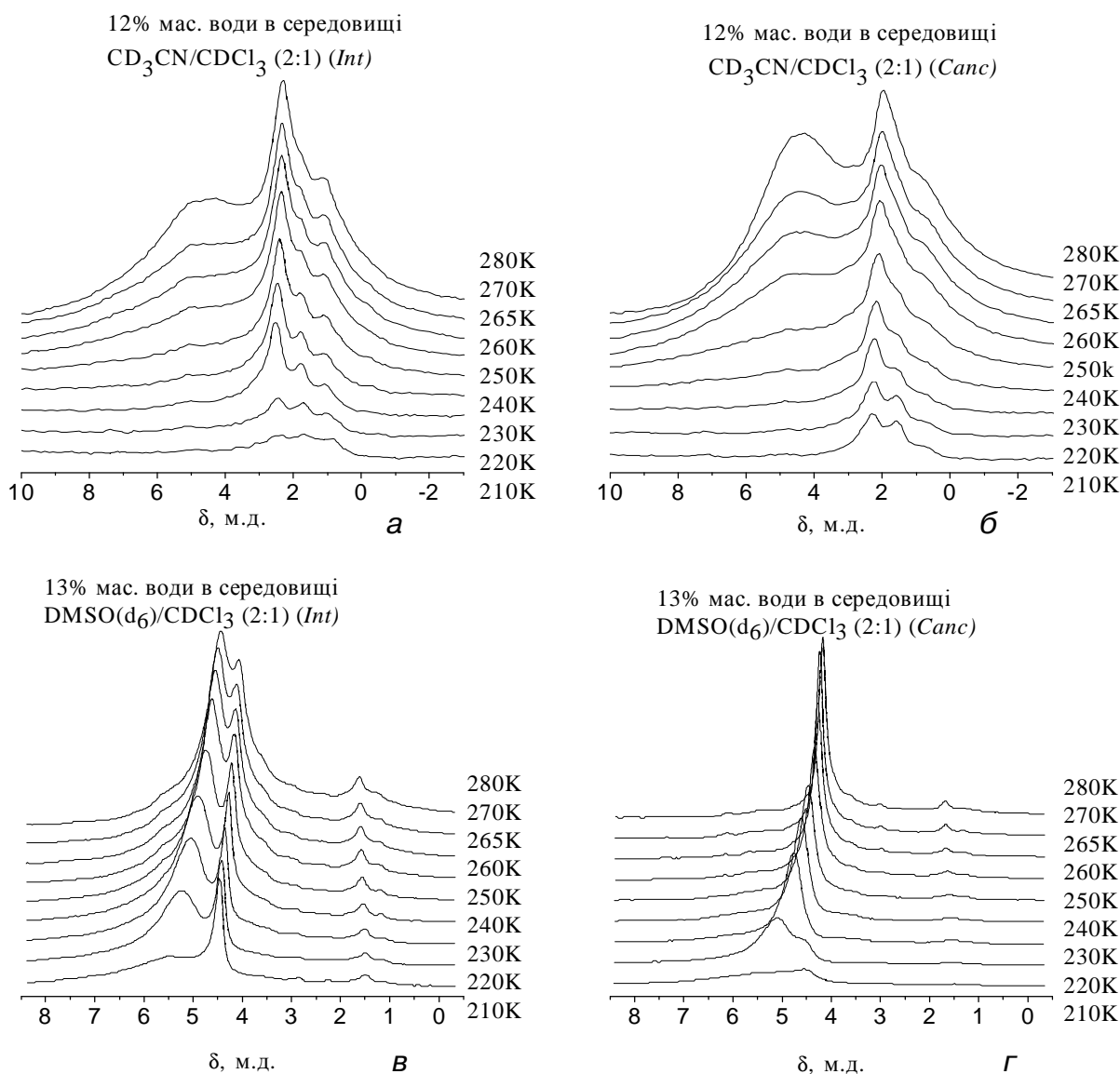


Рис. 3. Спектри води ліофілізованого гомогенізату клітин печінки інтактних щурів (а, в) та з карциномою (б, г) за присутності водно-органічних систем: $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{CN}$ (а, б) і $\text{CDCl}_3/(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ (в, г).

ли. Для зразка *Canc* у системі $\text{CDCl}_3 + (\text{CD}_3)_2\text{SO}$ в широкому діапазоні температур обмін між молекулами води, що входить до складу кластерів сильноасоційованої води і водневозв'язаних комплексів $\text{HOH}\dots\text{OS}(\text{CD}_3)_2$, залишається швидким (у шкалі часу ЯМР) в широкому температурному інтервалі й уповільнюється тільки при $T < 230$ К. Для систем, які містять CD_3CN при вимерзанні основної частини води, в спектрах стають видимими сигнали CD_2HCN , недейтерованої складової ацетонітрилу, з хімічним зсувом $d \sim 2$ м.д.

На рисунку 4 наведено залежності концентрації незамерзаючої води від температури (а,в) і побудовані на їх основі згідно з формулою (1) залежності зміни вільної енергії Гіббса від концентрації незамерзаючої води (б,г) для систем, спектри яких представлено на рисунку 2. При цьому окремо показано залежності $C_{uw}(T)$ і $DG(C_{uw})$ для сильно- (рис. 4, а, б) та сла-

боасоційованої води (рис. 4, в, г). Як видно з рисунка 4, в зразках *Int* і *Canc* для сильноасоційованої води ці залежності практично збігаються. Невеликі відмінності спостерігаються лише для зразків, які містять 10 % мас. адсорбованої води в середовищі CDCl_3 (для зразка *Canc* міжфазна вода замерзає при дещо вищій температурі). Разом із тим, для слабоасоційованої води в зразках *Int* і *Canc* залежності $C_{uw}(T)$ і $DG(C_{uw})$ відрізняються суттєво. В зразках, які містять 10 % мас. міжфазної води, концентрація слабоасоційованої води приблизно вдвічі вища для зразка *Canc*. Підвищення концентрації міжфазної води до 20 % мас. супроводжується відносним зменшенням внеску від слабоасоційованої води в зразках *Canc* і його зростанням для клітинних зразків *Int*. Відповідно до критеріїв, наведених в [10], вода, для якої зміна величини DG при заморожуванні не перевищує 0,5 кДж/моль (тем-

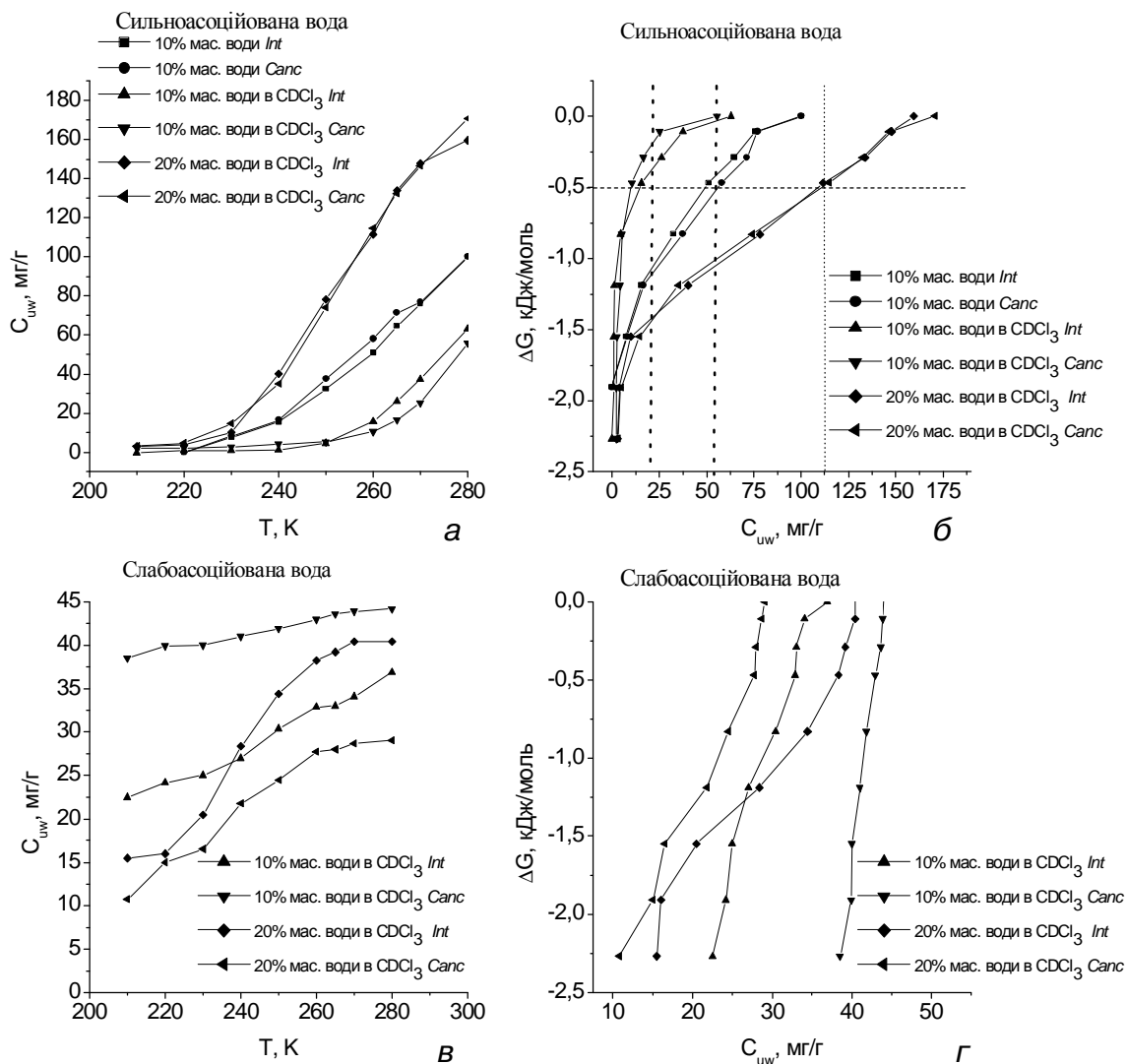


Рис. 4. Залежності концентрації незамерзаючої води (C_{uw}) від температури (а, в) та побудовані на їх основі залежності зміни міжфазної енергії Гіббса від C_{uw} для сильно- (а, б) і слабоасоційованої води (в, г).

пература замерзання не нижча 250 К), є слабозв'язаною. Тоді всю слабосоціювану воду слід відносити до сильнозв'язаної. Для сильноасоціюваної води слабозв'язаною є частина води, що перебуває справа від вертикальних пунктирних ліній.

На рисунку 5 показано залежності концентрації різних типів незамерзаючої води від температури для слабодігратованих гомогенізаторів зразків *Int* (а, в) і *Canc* (б, г) за присутності обмеженої кількості суміші електрондонорного розчинника з дейтерохлороформом (2:1). На рисунку 5, а-г також наведено залежності $C_{uw}(T)$ для всієї незамерзаючої води. На рисунку 6, а показано залежності $DG(C_{uw})$ для всіх вивчених систем, а на рисунку 6, б – розраховані відповідно до формули (2) величини міжфазних енергій. Як впливає з даних рисунка 5, а,

б, за присутності суміші ацетонітрил/хлороформ для інтактного клітинного гомогенізатору в широкому температурному інтервалі концентрація сильноасоціюваної води істотно менша порівняно з водою, що входить до складу комплексів $\text{HOH}\dots\text{NCCD}_3$. Для гомогенізатору зразка *Canc* цей діапазон значно звужується, і при $T > 260$ К концентрація сильноасоціюваної води стає приблизно вдвічі більшою, ніж комплексів $\text{HOH}\dots\text{NCCD}_3$. Незважаючи на значні відмінності в спектрах (рис. 2, 3) і характеристиках різних форм міжфазної води (рис. 4, 5), величини міжфазної енергії у вивчених системах для зразків *Int* і *Canc* значно відрізняються тільки в середовищі CDCl_3 при гідратованості гомогенізатору на рівні 20 % мас. (рис. 6).

Перехід за присутності слабополярного органічного розчинника значної частини адсор-

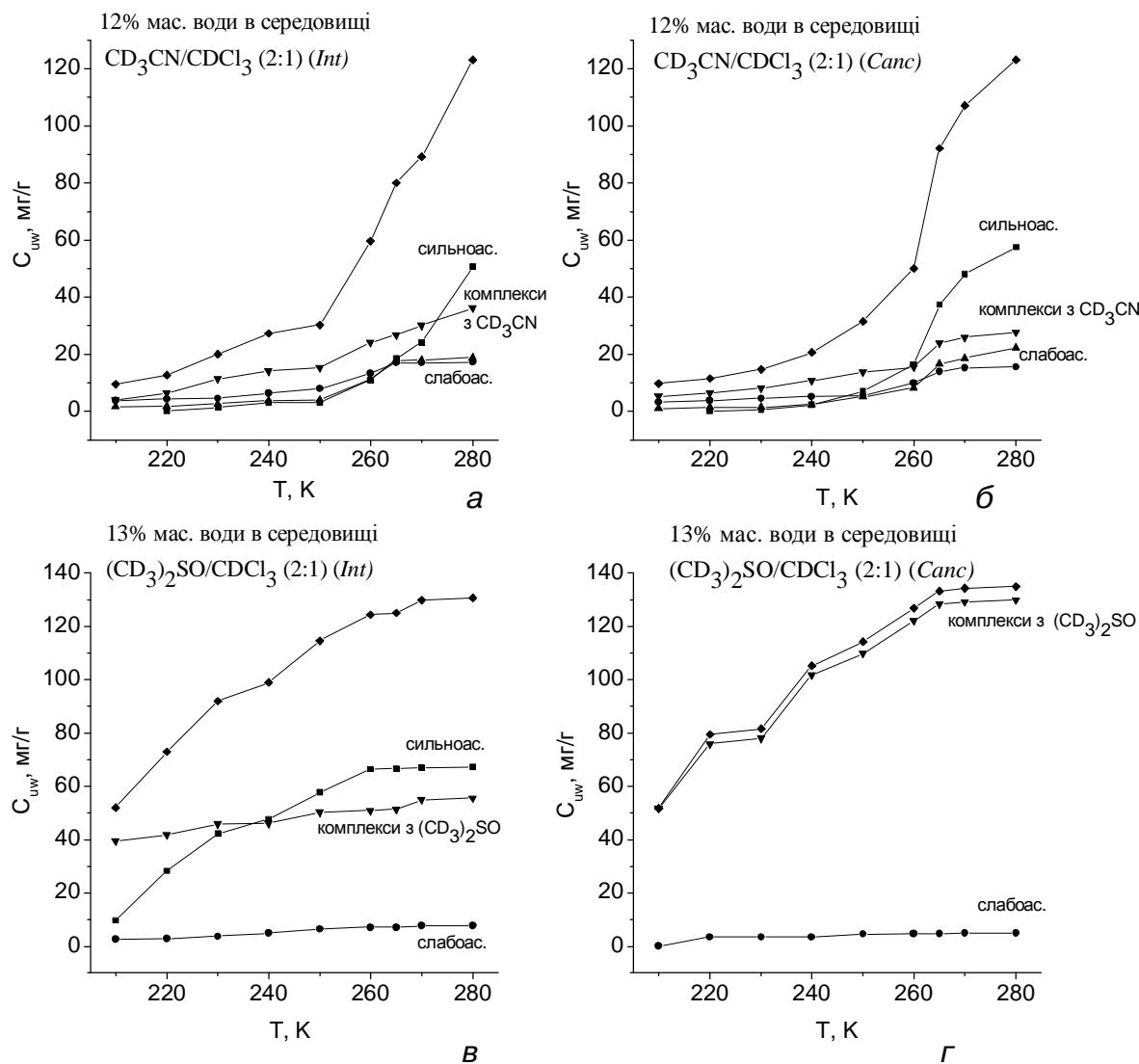


Рис. 5. Залежності концентрації різних типів незамерзаючої води (C_{uw}) від температури для зразків слабодігратованих гомогенізаторів *Int* (а, в) і *Canc* (б, г) за присутності сумішей $\text{CD}_3\text{CN}/\text{CDCl}_3$ (а, б); $(\text{CD}_3)_2\text{SO}/\text{CDCl}_3$ (в, г) у співвідношенні 2:1.

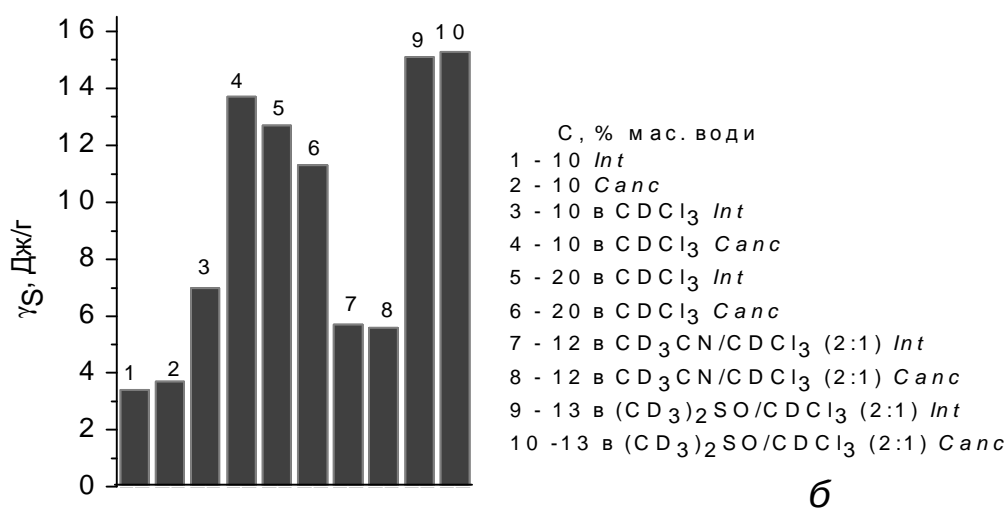
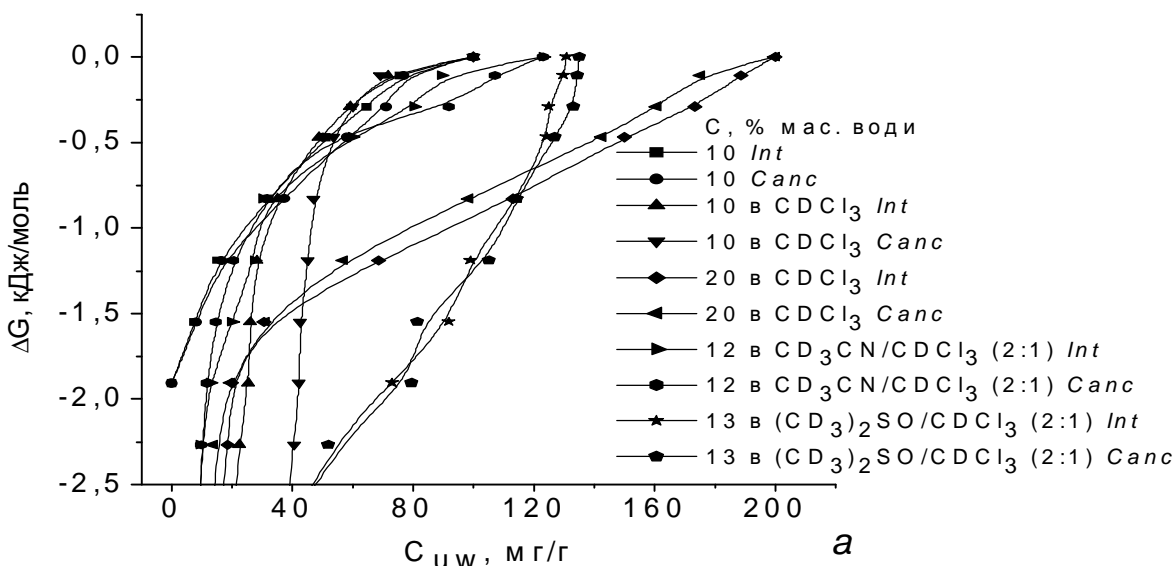


Рис. 6. Залежності зміни вільної енергії Гіббса від концентрації незамерзаючої води (C_{uw}) (а) і величини міжфазної енергії для інтактною і пухлинної тканин за присутності $CDCl_3$ та його сумішей з CD_3CN і $(CD_3)_2SO$ (б).

бованої води в слабоасоційований стан визначається двома основними факторами [13]: наявністю в клітинному гомогенізіаті гідрофобних та гідрофільних ділянок, що чергуються, і тим, що вони розміщені в порожнинах, розмір яких визначається одиницями нанометрів.

ВИСНОВКИ. Показано можливість формування на міжфазних межах частково дегідратованих клітинних гомогенізіатів кластерних утворів, до складу яких входять молекули води й органічні речовини. Кластероутворення здійснюється по-різному в зразках *Int* і *Canc*. Відмінності спостерігаються у відносно вузькому діапазоні їх гідратованості. В слабополярному середовищі хлороформу в онкомодифікованій тканині відбувається переважне збільшення концентрації слабоасоційованої

води, що проявляється, з одного боку, виникненням інтенсивного 1H ЯМР сигналів (або сигналів) з хімічними зсувами в діапазоні 1-2 м.д. (рис. 2), а з іншого – значним підвищенням величини міжфазної енергії (рис. 6). Це відображає зміну гідрофільно-ліпофільних властивостей внутрішньоклітинного матеріалу.

Для сумішей хлороформу з електронодонорними розчинниками (ДМСО, ацетонітрил) є вузький діапазон співвідношення концентрацій води й органічних компонентів, в якому спектри обох зразків значно відрізняються. Ці відмінності стосуються насамперед співвідношення інтенсивностей сигналів сильноасоційованої води і водневозв'язаних комплексів $HOH...NCCD_3$ та швидкостей молекулярного обміну між сильнозв'язаною водою і комплексами $HOH...OS(CD_3)_2$.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Глушков В.П. Термодинамические свойства индивидуальных веществ. – М.: Наука, 1978. – С. 74.
2. Туров В.В., Горбик С.П., Чуйко А.А. Влияние дисперсного кремнезема на связанную воду в замороженных клеточных суспензиях // Проблемы криобиологии. – 2002. – **3**. – С. 16-23.
3. Туров В.В., Горбик С.П., Чуйко А.А. Применение метода ¹H ЯМР спектроскопии для определения энергии взаимодействия клеток с водной средой // Доповіді НАН України. – 2002. – **3**. – С. 141-145.
4. Туров В.В., Гунько В.М., Горбик П.П., Керусь С.В. Структурная и энергетическая дифференциация воды в частично обезвоженных клетках *Saccharomycetes cerevisiae* под влиянием органических растворителей // В кн.: Химия, физика и технология поверхности (ред. П.П. Горбик). – К.: Наукова думка, 2007. – С. 253-264.
5. Туров В.В., Гунько В.М., Горбик П.П. и др. Процессы самоорганизации в водно-органических системах в наноразмерном пространстве твердых тел и биологических объектов // В кн.: Физико-химия наноматериалов и супрамолекулярных структур (ред. А.П. Шпак, П.П. Горбик). – К.: Наукова думка, 2007. – С. 91-157.
6. Чехун В.Ф. Компоненты протеому – складова молекулярної діагностики і терапії // Журн. Акад. мед. наук України – 2004. – **10** (2). – С. 273-276.
7. Чехун В.Ф., Ганина К.П., Кулик Г.И. и др. Влияние фенотипа лекарственной резистентности опухоли на динамику индуцированных цисплатином изменений структуры хроматина интерфазных ядер лимфоцитов периферической крови крыс с карциномой Герена // Цитология и генетика. – 2000. – **54** (5). – С. 11-17.
8. Чехун В.Ф., Кулик Г.И., Триндяк В.П., Тодор І.М. Молекулярно-біологічні аспекти структурно-функціонального стану клітинної поверхні як основа розвитку нової стратегії терапії раку // Онкологія. – 2000. – **4** (1). – С. 4-8.
9. Chaplin M.F. A proposal for structuring of water // Biophys. Chem. – 1999. – **83**. – P. 211-221.
10. Gun'ko V.M., Turov V.V., Bogatyrev V.M. et al. Unusual properties of water at hydrophilic/hydrophobic interfaces // Adv. Colloid Interf. Sci. – 2005. – **118**. – P. 125-172.
11. Gun'ko V.M., Turov V.V. Structure of hydrogen bonds and ¹H NMR spectra of water at the interface of oxides // Langmuir. – 1999. – **15**. – P. 6405-6415.
12. Gun'ko V.M., Turov V.V., Turov A.V. et al. Behaviour of pure water and water mixture with benzene or chloroform adsorbed onto ordered mesoporous silica // Central Europ. J. Chem. – 2007. – **5**, № 2. – P. 420-454.
13. Pople J.A., Schneider W.G., Bernstein H.J. High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance. – New York: McGraw-Hill Book Company, 1959. – P. 49-57.
14. Turov V.V., Gun'ko V.M., Bogatyrev V.M. et al. Structured water in partially dehydrated yeast cells and at partially hydrophobized fumed silica surface // J. Coll. Interface Sci. – 2005. – **283**, № 2. – P. 329-343.
15. Turov V.V., Lebeda R. Application of ¹H NMR spectroscopy method for determination of characteristics of thin layers of water adsorbed on the surface of dispersed and porous adsorbents // Adv. Colloid Interface Sci. – 1999. – **79**. – P. 173-211.
16. Wiggins P.M. High end low density water in gel // Progr. Polim. Sci. – 1995. – **20**. – P. 1121-1163.
17. Wiggins P.M. Role of water in some biological processes // Microbiol. Rev. – 1990. – **54**. – P. 432-439.

В.В. Туров¹, С.В. Керусь¹, С.В. Чехун¹, И.Н. Тодор², В.Ф. Чехун²
 ИНСТИТУТ ХИМИИ ПОВЕРХНОСТИ ИМЕНИ А.А. ЧУЙКО НАН УКРАИНЫ¹, КИЕВ
 ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИИ, ОНКОЛОГИИ И РАДИОБИОЛОГИИ
 ИМЕНИ Р.Е. КАВЕЦКОГО НАН УКРАИНЫ², КИЕВ

КЛАСТЕРООБРАЗОВАНИЕ ВОДЫ В ЛИОФИЛИЗИРОВАННОМ ГОМОГЕНАТЕ ТКАНИ ПЕЧЕНИ ИНТАКТНЫХ И КРЫС С КАРЦИНОМОЙ ГЕРЕНА

Резюме

Методом ¹H ЯМР спектроскопии при низких температурах проведено сравнительное исследование состояния воды в лиофилизированной ткани печени интактных крыс и крыс с трансплантированной карциномой Герена. Подобраны соотношения концентраций полярных и неполярных органических растворителей, при которых наблюдается существенная разница кластерной структуры воды в интактных клетках и патологически измененных.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: межфазная граница, связанная вода, кластерные образования, карцинома Герена.

V.V. Turov¹, S.V. Kerus¹, S.V. Chekhun¹, I.M. Todor², V.F. Chekhun²
O.O. CHUYKO INSTITUTE OF SURFACE CHEMISTRY OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF
UKRAINE², KYIV
R.Ye. KAVETSKYI INSTITUTE OF EXPERIMENTAL PATHOLOGY, ONCOLOGY AND RADIOBIOLOGY OF THE
NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF UKRAINE², KYIV

FORMATION OF WATER CLUSTERS IN FREEZE-DRYING HOMOGENATE OF LIVER TISSUE OF INTACT RATS AND RATS WITH HEREN'S CARCINOMA

Summary

Comparative research of water condition in freeze-drying liver tissue of intact rats and rats with transplanted Heren's carcinoma were studied by ¹H NMR spectroscopy at low temperatures. It was selected concentration correlation of polar and nonpolar organic solvents at which there is a significant difference of water cluster structure in intact cells and pathological changed cells.

KEY WORDS: interfacial border, bound water, cluster formations, Heren's carcinoma.

Отримано 18.06.10

Адреса для листування: В.В. Туров, Інститут хімії поверхні імені О.О. Чуйка НАН України, вул. Генерала Наумова, 17, Київ-164, 03164, Україна.

**ВПЛИВ ДОПОМІЖНИХ РЕЧОВИН НА БІОФАРМАЦЕВТИЧНІ
ВЛАСТИВОСТІ СУПОЗИТОРІЇВ З ЕНАЛАПРИЛУ МАЛЕАТОМ**

Проведено дослідження впливу виду основи-носія і виду поверхнево-активних речовин (ПАР) на вивільнення еналаприлу малеату із супозиторіїв ректальних. Встановлено, що вид основи-носія і вид ПАР впливають на вивільнення еналаприлу малеату з даної лікарської форми. Виявлено взаємодію досліджуваних факторів, що справляє статистично значущий вплив на вивільнення діючої речовини із супозиторіїв. Встановлено, що найбільший вплив на вивільнення еналаприлу малеату із супозиторіїв має вид супозиторної основи. Дисперсійний аналіз результатів досліджень показав, що оптимальне вивільнення еналаприлу малеату із супозиторіїв ректальних забезпечує композиція олії какао та твіну 80.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: еналаприлу малеат, основа-носії, поверхнево-активні речовини, вивільнення.

ВСТУП. Артеріальна гіпертензія є одним із найбільш поширених серцево-судинних захворювань, яке спричиняє ризик виникнення серцевих, мозкових та ниркових ускладнень, а також передчасної смерті. Корекція артеріальної гіпертензії – складний процес, який передбачає раннє виявлення патології, її адекватне лікування, проведення первинної та вторинної профілактики [5, 7].

Фармакотерапевтичний арсенал антигіпертензивних засобів досить великий, але багато лікарських форм при тривалому застосуванні викликає низку небажаних реакцій з боку організму пацієнтів. Не в останню чергу це пов'язано з тим, що основним шляхом введення антигіпертензивних засобів є пероральний. Це не завжди безпечно, оскільки при наявності ускладнень артеріальної гіпертензії (найчастіше у вигляді серцевої недостатності) та необхідності їх відповідної медикаментозної терапії комбіноване призначення препаратів збільшує ризик виникнення явища несутимності або пошкодження слизової оболонки шлунка.

Застосування для лікування артеріальної гіпертензії ректального шляху введення препаратів, що призводять до зменшення артеріального тиску, дозволяє за рахунок специфіки всмоктування лікарських речовин у прямій кишці знизити дозу приймання і, відповідно, уникнути виникнення небажаних побічних

реакцій, а також підвищити біологічну доступність антигіпертензивних засобів [6, 10]. Препарати інгібітори АПФ протягом тривалого часу використовують для терапії есенціальної та хронічної гіпертензії. Одним із найбільш вивчених лікарських засобів цієї фармакологічної групи є еналаприлу малеат [8, 11].

Розробка ректальної лікарської форми еналаприлу малеату дозволить розширити можливості та збільшити ефективність його застосування у фармакотерапії неускладнених гіпертензивних кризів як ургентних клінічних станів, збагатити номенклатуру вітчизняних кардіологічних препаратів.

Властивості, стабільність, біологічна доступність та фармакотерапевтична ефективність супозиторіїв залежать від виду основи, природи інших допоміжних речовин, використаної технології [1, 12].

Метою даної роботи було вивчення впливу супозиторних основ-носіїв на біофармацевтичні характеристики ректальної лікарської форми еналаприлу малеату.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Як носії для ректальної лікарської форми еналаприлу малеату досліджували супозиторні основи та поверхнево-активні речовини (ПАР), що знаходять широке застосування при промисловому та аптечному виробництві м'яких лікарських форм та описані в літературі [2, 3]. Супозиторії готували методом виливання з використанням форм від напівавтомата Франко-Креспі (Ни-

© Г.П. Лисянська, В.В. Гладішев, І.Л. Кечин, 2010.

жегородський ХФЗ). Середня маса супозиторія на ліпофільних основах склала 1,3 г, а на поліетиленоксидній – 1,6 г. Концентрація ПАР у всіх дослідях – 2 % від маси супозиторіїв, вміст еналаприлу малеату – 0,025 г у кожному супозиторії. Дослідження проводили за планом двофакторного дисперсійного аналізу з повторними спостереженнями [9]. Параметром оптимізації обрали вивільнення еналаприлу малеату із супозиторіїв як перший етап визначення біологічної доступності. Вивільнення еналаприлу малеату із супозиторіїв проводили на приладі АК-1 (“кошик”) з використанням свіжопрепарованої та відмитої в ізото-

нічному розчині прямої кишки щура [4]. Діалізічним середовищем обрано буферний розчин із рН=7,2, що відповідає кислотності нижньоампулярних відділів прямої кишки [13], температура діалізного середовища складала (37±0,5) °С. Концентрацію еналаприлу малеату, що вивільнився через 30 хв, встановлювали спектрофотометрично [14].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Матриця планування експерименту та результати визначення концентрації еналаприлу малеату, що вивільнився із супозиторіїв через 30 хв, наведено в таблиці 1.

Таблиця 1 – Матриця планування та результати визначення концентрації (%) еналаприлу малеату, що вивільнився із супозиторіїв (інтервал 30 хв)

Фактор А	Фактор В				Сума
	В ₁ Ем. № 1	В ₂ МГД	В ₃ Твін 80	В ₄ Без ПАР	
a ₁	1) 58,1 58,08 <u>58,06</u> 174,24	2) 68,26 62,87 <u>62,57</u> 193,7	3) 83,23 76,65 <u>70,06</u> 229,94	4) 46,7 51,5 <u>49,1</u> 147,3	745,18
a ₂	5) 88,62 88,02 <u>88,32</u> 264,96	6) 77,84 83,2 <u>80,22</u> 241,26	7) 93,4 89,8 <u>91,26</u> 274,46	8) 83,23 81,7 <u>82,44</u> 247,37	1028,05
a ₃	9) 90,4 88,62 <u>92,8</u> 271,82	10) 78,22 81,7 <u>75,45</u> 235,37	11) 95,6 95,8 <u>95,64</u> 287,04	12) 67,07 70,06 <u>69,04</u> 206,17	1000,4
a ₄	13) 76,44 75,45 <u>77,24</u> 229,13	14) 95,81 95,8 <u>96,18</u> 287,79	15) 67,6 70,06 <u>70,06</u> 207,72	16) 52,7 54,06 <u>56,87</u> 163,63	888,27
Сума	940,15	958,12	999,16	764,47	3661,9

Примітки:

1. А – супозиторні основи: a₁ – твердий жир; a₂ – олія какао; a₃ – заводська жирова основа; a₄ – суміш поліетиленоксидів із молекулярною масою 1500 та 400 у співвідношенні 9:1.

2. В – поверхнево-активні речовини: v₁ – емульгатор № 1; v₂ – моногліцериди дистильовані; v₃ – твін 80; v₄ – без емульгатора.

Під час виготовлення супозиторіїв на ПЕО-основі еналаприлу малеат розчиняли у розплаві поліетиленоксидів при нагріванні. До інших основ його вводили за типом суспензії, ретельно подрібнюючи лікарську речовину із частиною основи, з подальшим додаванням отриманої суміші до всієї розплавленої основи.

У таблиці 2 представлено дисперсійний аналіз отриманих результатів.

Як впливає з наведених даних, природа супозиторних основ та ПАР, які вивчали, чи-

нили значущий вплив ($F_{\text{експ.}} > F_{\text{табл.}}$) на вивільнення еналаприлу малеату з виготовлених супозиторіїв. При цьому фактори вступали у взаємодію один з одним, що справляло статистично значущий вплив на вивільнення діючої речовини з лікарської форми.

На основі отриманих даних складено ряд впливу вивчених факторів на інтенсивність вивільнення лікарської речовини із супозиторних композицій: A>B>AxB. Найбільше на вивільнення еналаприлу малеату із супозиторіїв

Таблиця 2 – Дисперсійний аналіз результатів визначення вивільнення еналаприлу малеату із супозиторіїв ректальних

Джерело мінливості	Сума квадратів	Число ступенів свободи	Середній квадрат	F _{експ.}	F _{табл.}
Фактор А	3969,292	3	1323,097	216,866	2,9
Фактор В	3407,375	3	1135,792	186,165	2,9
АхВ – взаємодія	956,591	9	106,288	17,421	2,25
Похибка	195,217	32	6,101	-	-
Загальна сума	285992,3	47	-	-	-

впливали вид супозиторної основи та вид поверхнево-активних речовин.

Перевірка відмінності середніх результатів значущих факторів за допомогою множинного рангового критерію Дункана [9] дозволила побудувати такі ряди переваг:

За фактором А (вид основи-носія)
 a_2 (олія какао) > a_3 (ЗЖО) > a_4 (ПЕО) > a_1 (твердий жир)

За фактором В (вид ПАР)
 v_3 (твін 80) > v_1 (емульгатор № 1) > v_2 (МГД) > v_4 (без ПАР).

Таким чином, найбільш швидке вивільнення еналаприлу малеату відмічали для композиції на основі олії какао з використанням твіну 80.

ВИСНОВКИ. 1. Встановлено, що вид основи-носія та вид ПАР справляють значущий вплив на вивільнення еналаприлу малеату з виготовлених супозиторіїв. Також виявлено взаємодію вивчених факторів, що чинять статистично значущий вплив на вивільнення діючої речовини з лікарської форми.

2. Виявлено, що найбільше на вивільнення еналаприлу малеату із супозиторіїв впливає вид супозиторної основи.

3. Дисперсійний аналіз результатів досліджень показав, що оптимальне вивільнення еналаприлу малеату із супозиторіїв ректальних забезпечує композиція олії какао та твіну 80.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Гладышев В.В. Теоретическое и экспериментальное обоснование создания мягких лекарственных форм антимикотического действия : автореф. дисс. д-ра фармацевт. наук : спец. 15.00.01 "Технология лекарств и организация фармацевтического дела" / В.В. Гладышев. – Пятигорск, 1997. – 34 с.
- Головкин В.А. Вагинальные лекарственные средства: Особенности разработки, исследования и применения / В.А. Головкин, В.В. Головкин, А.В. Головкин. – Запорожье : РИП "Видавец", 2000. – 271 с.
- Головкин В.А. Лекарственные средства для ректального применения в педиатрии / В.А. Головкин, В.В. Головкин, Ю.П. Ткаченко. – Запорожье : Просвіта, 2006. – 140 с.
- Дуева О.В. Биофармацевтическое обоснование состава и технологии лекарственных форм с тиотриазалином : автореф. дисс. канд. фармацевт. наук : спец. 15.00.01 "Технология лекарств и организация фармацевтического дела" / О.В. Дуева. – Харьков, 1987. – 24 с.
- Дядык А.И. Артериальные гипертензии в современной клинической практике / А.И. Дядык, А.Э. Багрий. – Донецк : Норд-Пресс, 2006. – 322 с.
- Кечин І.Л. Фармакологічна корекція неуспадкових гіпертензивних кризів антигіпертензивними

- препаратами для апікаційного застосування : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня д-ра мед. наук : спец. 14.01.28 "Клінічна фармакологія" / І.Л. Кечин. – К., 2003. – 41 с.
- Ленфант К. Гипертензия и её последствия: Состояние проблемы в мире / К. Ленфант // Здоров'я України. – 2006. – № 5. – С. 32.
- Мареев В.Ю. Новый век – эра применения ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента в кардиологии / В.Ю. Мареев // Сердечная недостаточность. – 2001. – № 4. – С. 149-151.
- Методические указания по обработке результатов эксперимента по технологии лекарств / А.И. Тенцова, Т.А. Грошовый, В.А. Головкин, С.М. Махамов. – Ташкент : НИИ "Узгипрозем", 1980. – 71 с.
- Нагорний В.В. Биофармацевтичне обґрунтування раціонального складу і технології супозиторіїв з натрію нітропрусидом / В.В. Нагорний // Фармац. журн. – 1998. – № 1. – С. 106-109.
- Сидоренко Б.А. Ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента при лечении гипертонической болезни / Б.А. Сидоренко, М.В. Савченко, Д.В. Преображенский // Кардиология. – 2000. – № 2. – С. 74-82.
- Цагарейшвили Г.В. Биофармацевтические, фармакокинетические и технологические аспекты

создания мягких лекарственных форм (ректальные препараты) / Г.В. Цагарейшвили, В.А. Головкин, Т.А. Грошовый. – Тбилиси : Мецниереба, 1987. – 263 с.

13. Чуркин И.А. Применение прицельной эндоскопической рН-метрии для оценки функционального состояния слизистой прямой и сигмовидной ободочной кишки : автореф. дисс. канд. мед. наук : спец. 03.00.13 “Физиология”. – Томск, 2002. – 23 с.

14. Lokesh B.V.S. New dissolution method for the evaluation of enalapril maleate tablets using 7.2 phosphate buffer in vitro and determination of its content by validated UV spectrophotometric method / B.V.S. Lokesh, Naidu S. Raghava // JASA. – 2007. – № 2. – P. 34-37.

А.П. Лисянская, В.В. Гладышев, И.Л. Кечин
ЗАПОРОЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

ВЛИЯНИЕ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ НА БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СУППОЗИТОРИЕВ С ЭНАЛАПРИЛА МАЛЕАТОМ

Резюме

Проведены исследования влияния вида основы-носителя и вида поверхностно-активных веществ (ПАВ) на высвобождение эналаприла малеата из суппозиториев ректальных. Установлено, что вид основы-носителя и вид ПАВ влияют на высвобождение эналаприла малеата из данной лекарственной формы. Выявлено взаимодействие исследуемых факторов, оказывающее статистически значимое влияние на высвобождение действующего вещества из суппозиториев. Установлено, что наибольшее влияние на высвобождение эналаприла малеата из суппозиториев имеет вид суппозиторной основы. Дисперсионный анализ результатов исследований показал, что оптимальное высвобождение эналаприла малеата из суппозиториев ректальных обеспечивает композиция масла какао и твина 80.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эналаприла малеат, основа-носитель, поверхностно-активные вещества, высвобождение.

H.P. Lysianska, V.V. Hladyshev, I.L. Kechyn
ZAPORIZHIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY

INFLUENCE OF EXCIPIENTS ON BIOPHARMACEUTICAL PROPERTIES OF SUPPOSITORIES WITH ENALAPRIL MALEATE

Summary

Investigation of influence of base type and surfactants on release of enalapril maleate from rectal suppositories has been carried out. It has been determined that base type and surfactants have significant influence on release of enalapril maleate from this pharmaceutical form. Statistically significant influencing factors have been studied. It has been determined that influence on release of enalapril maleate has suppositories. Dispersive analysis has shown that the optimum release of enalapril maleate from rectal suppositories provide by the composition of cacao butter and twin 80.

KEY WORDS: enalapril maleate, base, surfactants, release.

Отримано 29.09.10

Адреса для листування: В.В. Гладышев, просп. Маяковського, 26, Запоріжжя, 69095, Україна.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

ЛІПІДНИЙ ПРОФІЛЬ І ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНИЙ ГОМЕОСТАЗ У ДОДІАЛІЗНИХ ПАЦІЄНТІВ ІЗ КАЛЬЦИНОЗОМ КЛАПАНІВ СЕРЦЯ

Вивчено динаміку показників ліпідного профілю та прооксидантно-антиоксидантної системи у додіалізних хворих із кальцинозом клапанів серця. Встановлено, що кальцифікація клапанного апарату серця за умов додіалізної стадії хронічної хвороби нирок поєднується з розвитком оксидативного стресу при незначимих порушеннях ліпідного гомеостазу. Зроблено висновок про доцільність застосування засобів, що проявляють нормалізуючий вплив на рівень ліпідної пероксидації та антиоксидантний стан у додіалізних пацієнтів із клапанним кальцинозом.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: хронічна хвороба нирок, додіалізна стадія, кальциноз клапанів серця, оксидативний стрес, ліпідний обмін.

ВСТУП. На сучасному етапі проблема кальцинозу клапанів серця (ККС) у хворих на хронічну хворобу нирок (ХХН) набуває особливо значення, оскільки зустрічається надто часто [25] та відіграє суттєву роль у формуванні, перебігу серцево-судинної патології і виникненні фатальних подій – розвитку тяжких серцевих дисфункцій, порушень серцевого ритму, серцевої недостатності (СН), артеріальних емболій і раптової смерті [14, 27]. Згідно з літературними даними, в останні роки все більшу увагу в розвитку і прогресуванні кардіоваскулярних ускладнень, у т.ч. кальцифікації, як у додіалізній, так і в діалізній стадіях ХХН приділяють порушенням ліпідного гомеостазу та активації вільнорадикального окиснення ліпідів [22, 24]. Проте роль зазначених змін у механізмах реалізації останньої у додіалізних пацієнтів вивчено недостатньо. Так, повідомлення щодо характеру зв'язку клапанного кальцинозу і ліпідного профілю за цих умов є поодинокими [2] або ж стосуються загальної популяції [7, 21], а значення оксидативного стресу (ОС) в патогенезі ККС показано лише у хворих, які перебувають на хронічному гемодіалізі (ГД) [4]. Тому метою даного дослідження стало визначення ролі порушень ліпідного обміну та прооксидантно-антиоксидантної системи в механізмах кальцифікації клапанного апарату серця у хворих із додіалізною стадією ХХН.

© О.Б. Сусла, 2010.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. У дослідження включено 149 (чоловіки/жінки, 69/80; вік – $48,5 \pm 13,4$) років) хворих на додіалізну ХХН I-V стадій, які перебували на лікуванні в нефрологічному відділенні Тернопільської університетської лікарні. Пацієнтів із хронічним пієлонефритом було 37,6 %, із хронічним гломерулонефритом – 25,5 %, із діабетичною нефропатією – 18,8 %, із полікістозом нирок – 8,1 %, із гіпертонічною хворобою – 3,4 %, з іншими – 6,7 %. Швидкість клубочкової фільтрації, визначена за формулою MDRD, в середньому становила $(49,8 \pm 28,5)$ мл/хв/1,73 м². Хворі на ХХН I стадії склали 7,4 %, II стадії – 25,5 %, III стадії – 40,9 %, IV стадії – 19,5 %, V стадії – 6,7 %. Стан мітрального (МК), аортального клапанів (АК) (норма, ущільнення, кальциноз), наявність клапанних дисфункцій, морфометричні та функціональні параметри серця вивчали шляхом проведення доплер-ЕхоКС дослідження на ультразвуковій системі “НДІ-1500” (США) [1].

Всім хворим проводили загальноклінічне обстеження, включаючи вивчення анамнезу, клінічної симптоматики, стандартні лабораторні й інструментальні тести. Матеріалами дослідження були сироватка крові, плазма крові й цільна кров. З метою дослідження ліпідного обміну визначали вміст загального холестерину (ЗХС), ХС у ліпопротеїдах високої щільності (ХС-ЛПВЩ) і тригліцеридів (ТГ). Вміст ХС у ліпопротеїдах низької щільності (ХС-ЛПНЩ) розраховували за формулою Фридвальда.

Показники активності пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) вивчали такими методами: вміст малонового діальдегіду (МДА) визначали фотоколориметричним методом за інтенсивністю забарвленого комплексу, який утворюється при взаємодії МДА з тіобарбітуровою кислотою в кислому середовищі [17]; стан антиоксидантної системи (АОС) визначали такими методами: активність каталази (КТ) (КФ 1.11.1.6) – фотоколориметричним методом за інтенсивністю забарвленого комплексу, який утворюється при взаємодії пероксиду водню з молібдатом амонію [11], активність супероксиддисмутази (СОД) (КФ 1.15.1.1) – за ступенем інгібування відновленого нітротетразолію синього [6], концентрацію SH-груп у реакції з п-меркурбензоатом натрію, вміст церулоплазміну (ЦП) (КФ 1.16.3.1) – за кількістю утворених забарвлених продуктів окиснення п-фенілендіаміну за присутності ЦП [10].

Дослідження виконано з дотриманням положень Конвенції Ради Європи про права людини та біомедицину і рекомендацій Комітету з біоетики при Президії АМН України.

Для статистичного аналізу даних використовували пакет прикладних програм STATISTICA (StatSoft, USA, v6.0). Застосовували методи непараметричної статистики – U-кри-

терій Манна-Уїтні для порівняння показників у двох групах. Статистично значимими вважали відмінності при $p < 0,05$. При описуванні кількісних ознак було представлено середні значення і їх стандартні відхилення ($M \pm SD$), якісних – проценти (%).

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Кальциноз серцевих клапанів виявлено у 28,2 % пацієнтів із додіалізною стадією ХХН: ізольований кальциноз МК – у 5,4 %, АК – у 7,4 %, обох клапанів – у 15,4 %. Ми не встановили зв'язку ККС і параметрів ліпідного обміну, що узгоджується з даними [2], хоча є повідомлення про те, що гіперліпопротеїдемія прискорює процеси клапанної кальцифікації у ГД-хворих [29] (табл. 1). Зазначений характер ліпідного гомеостазу можна пояснити тим, що, відповідно до сучасних тенденцій, не кількісний, а якісний характер змін ліпопротеїдів і/чи зміна співвідношення окремих їх фракцій/субфракцій крові відіграє неабияку роль у механізмах атерогенезу, а отже, і кальцинозу [13, 20]. Саме модифікованим/окисненим ліпопротеїдам надають особливого значення в ініціації і розгортанні ендотеліального пошкодження, а провідним фактором трансформації останніх за цих умов є розвиток системного ОС [18, 30].

Таблиця 1 – Показники ліпідного обміну та прооксидантно-антиоксидантної системи у додіалізних пацієнтів залежно від наявності/відсутності кальцинозу клапанів серця

Параметр	Кальцинозу немає (n=107)	Кальциноз є (n=42)	Z (для U-критерію)	p
ХС, ммоль/л	5,59±1,52	5,24±1,56	0,967	0,333
ХС-ЛПНЩ, ммоль/л	3,58±1,51	3,21±1,42	1,099	0,272
ХС-ЛПВЩ, ммоль/л	1,22±0,27	1,29±0,27	1,240	0,215
ТГ, ммоль/л	1,74±0,85	1,63±0,78	0,433	0,665
МДА, мкмоль/л	6,29±1,47	7,41±1,14	4,390	<0,001
СОД, ум. од.	40,00±9,24	34,59±8,20	3,286	0,001
КТ, %	61,08±7,12	58,02±8,90	1,844	0,065
ЦП, мг/л	444,6±81,3	500,4±73,8	3,794	<0,001
SH-групи, ммоль/л	46,24±6,92	43,18±7,26	2,544	0,011

Порівняльний аналіз показників прооксидантно-антиоксидантної системи у пацієнтів обох груп показав, що у хворих із ККС, на відміну від пацієнтів без кальцинозу, були вищі величини МДА, ЦП, нижчі – активність СОД, КТ і вміст SH-груп (табл. 1). Виснаження антиоксидантних резервів, дезорганізація АОС, очевидно, сприяють ініціації ПОЛ і активації вільнорадикального окиснення ліпідів у хворих із клапанним кальцинозом.

Можливо, нагромадження одного з прикінцевих продуктів ПОЛ, якому притаманні мем-

бранотоксичні властивості, зумовлює пошкодження плазматичних і мітохондріальних мембран ендотеліальних клітин, знижує активність ліпідозалежних ферментативних реакцій, до яких належать ферменти іонного транспорту та дихального ланцюга мітохондрій, змінює мембранорецепторні системи клітини з розвитком медіаторного дисбалансу, активує протеолітичні й лізосомальні ферменти. Відбувається прискорений апоптоз ендотеліоцитів [16]. Крім того, ОС модулює остеобластну трансформацію клітин судин [26]. Гальмуван-

ня активності СОД, яка каталізує процес дисмутації супероксидних радикалів, у додіалізних пацієнтів із клапанним кальцинозом, очевидно, є наслідком незворотного відновлення міді в активному центрі ферменту або ж окиснення в ньому деяких функціональних груп, зокрема тіолових. Крім того, інгібування ферменту може бути результатом взаємодії активного центру СОД із гідропероксидами ненасичених жирних кислот [15], що є посередниками дієнових кон'югат, підвищення рівня яких спостерігається за умов ХХН при інтенсифікації вільнорадикальних процесів [19]. Від зниження активності СОД може залежати прогресування ендотеліальної дисфункції у пацієнтів з ураженням коронарних судин [30]. Зафіксована нами тенденція до зниження активності КТ, яка попереджує акумуляцію пероксиду водню, в додіалізних хворих із ККС може бути пов'язана з вираженим пригнічувальним впливом на даний фермент активних форм кисню, оскільки металоензими, які мають у своєму активному центрі металозв'язувальну ділянку та містять іони зі змінною валентністю, найбільше піддаються окиснювальній модифікації [8]. Цікаво, що зростання активності ЦП є прогностично несприятливою ознакою щодо розвитку ІХС [23]; підвищення цього мідьвмісного антиоксиданта як білка гострої фази вказує на напруженість компенсаторної реакції [9]; збільшення концентрації ЦП віддзеркалює феномен стресу, зумовленого СН і супутньою циркуляторною гіпоксією [3]. Зменшення вмісту SH-груп як одного з найважливіших неферментних компонентів АОС за умов клапанного кальцинозу у хворих із додіалізною стадією ХХН може призвести до зриву антирадикального/антипероксидного захисту і, як наслідок, спричинити зміни біомембран та структурно-функціональні зміни серцево-судинної системи, зокрема клапанного апарату серця. Зниження рівня SH-груп

вказує на пошкодження механізму тіолового ланцюга білкової фракції [5]. Варто відзначити, що SH-групи необхідні для формування багатьох важливих функцій білків, активності ферментів, роботи мембранних структур, взаємодії із зовнішнім середовищем клітин (ефекти гормонів, токсинів та ін.), різноманітних видів активного транспорту, діяльності цитоскелета, поділу клітин тощо [12].

Отже, за умов додіалізної стадії ХХН розвивається цілий каскад метаболічних перетворень, провідними механізмами якого є розвиток ОС і, найбільш імовірно, накопичення окиснених ліпопротеїдів, які можуть сприяти атерогенезу і бути фактором формування клапанного кальцинозу. Дослідження кальцинованих клапанів дозволяє виявити пошкодження ендотелію, потовщення субендотеліального шару, накопичення ліпідів, ліпопротеїдів, білків, запальних клітин, протеїнів кісткового матриксу, а також осередки інтенсивного зв'язування в зонах ліпідної акумуляції [28].

ВИСНОВКИ. 1. Кальциноз клапанів серця у хворих із додіалізною стадією хронічної хвороби нирок поєднується з активацією вільнорадикального окиснення ліпідів, що проявляється зростанням вмісту одного з прикінцевих продуктів пероксидного окиснення ліпідів (малоновий діальдегід), зміною активності ферментативної і неферментативної ланок антиоксидантної системи (знижуються активність супероксиддисмутази, каталази, вміст SH-груп, підвищується вміст церулоплазміну) та незначимими порушеннями ліпідного метаболізму.

2. Наявність оксидативного стресу в додіалізних пацієнтів із клапанним кальцинозом націлює на необхідність використання засобів, які проявляють нормалізуючий вплив на рівень ліпідної пероксидації та антиоксидантну систему, що й стане предметом наших подальших досліджень.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Вилкенсхоф У., Крук И. Справочник по эхокардиографии: Пер. с нем. – М.: Мед. лит., 2008. – 240 с.
2. Волков М.М., Смирнов А.В., Добронравов В.А. и др. Кальциноз сердечных клапанов у пациентов с хронической болезнью почек // Клиническая медицина. – 2009. – № 6. – С. 31-35.

3. Волчегорский И.А., Шапошник И.И., Алексеев Е.Н., Харченкова Н.В. Содержание продуктов перекисного окисления липидов и церулоплазмина в крови как показателя толерантности к физической нагрузке при гипертрофической кардиомиопатии // Клиническая лабораторная диагностика. – 2002. – № 2. – С. 11-13.

4. Гоженко А.І., Мисула І.Р., Сусла О.Б., Якубишина І.Г. Метаболічна складова кальцифікації клапанного апарату серця у хворих на програмному гемодіалізі // Мед. хімія. – 2009. – **11**, № 2. – С. 15-19.
5. Дадали В.А., Баскович Г.А., Радченко В.Г. и др. Биологически-активные добавки в лечении больных с сердечно-сосудистой патологией // Вестник Санкт-Петербург. гос. акад. – 2002. – № 12. – С. 101-104.
6. Дубинина Е.Е., Сальникова Л.А., Ефимова Л.Ф. Активность и изоферментный спектр супероксиддисмутазы эритроцитов и плазмы крови человека // Лаб. дело. – 1983. – № 10. – С. 30-33.
7. Иванов В.П., Юзвишина О.В., Габчак О.Л. Кальциноз хвороба клапанів серця: сучасні погляди на етіопатогенез // Укр. мед. часопис. – 2008. – № 5. – С. 102-107.
8. Кліщ І.М., Бойчук А.В., Корда М.М. Вираженість окиснювальної модифікації білків та стан антиоксидантної системи у щурів різного віку з токсичним ураженням тетрахлоретаном // Вісник наук. досліджень. – 2002. – № 1. – С. 39-41.
9. Ковтунова М.Е., Паньков В.Н., Перевалова Н.Н. Церулоплазмин и среднемолекулярные пептиды как критерии течения острого миелобластного лейкоза // Клини. лаб. д-ка. – 2003. – № 5. – С. 52-54.
10. Колб В.Г., Камышников В.С. Клиническая биохимия. – Минск: Беларусь, 1986. – 312 с.
11. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова Н.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16-19.
12. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Биологическая роль глутатиона // Успехи современ. биологии. – 1990. – **110**, № 1. – С. 20-33.
13. Лутай М.И., Голикова И.П., Слободской В.А. Роль дисфункции эндотелия, воспаления и дислипидемии в атерогенезе // Укр. кардіол. журн. – 2007. – № 5 – С. 37-47.
14. Мисула І.Р., Швед М.І., Сусла О.Б., Білик Н.М. Кальциноз клапанного апарату серця, ремодельовання лівого шлуночка і стан міокарда у хворих на хронічному гемодіалізі // Укр. мед. альманах. – 2009. – **12**, № 4. – С. 128-131.
15. Реброва Т.Ю., Маслов Л.Н., Там С.В. Вклад системы антиокислительных ферментов в реализацию кардиопротекторного эффекта опиоидов при окислительном стрессе // Вопросы мед. химии. – 2001. – **47**, № 3. – С. 338-345.
16. Руда М.М., Парфенова Е.В., Карпов Ю.А. Предшественники эндотелиальных клеток: роль в восстановлении функции эндотелия и перспективы терапевтического применения // Кардиология. – 2008. – № 1. – С. 66-73.
17. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. – С. 66-68.
18. Талаева Т.В., Братусь В.В. Атеросклероз: многофакторность и системность патогенеза // Укр. кардіол. журн. – 2007. – № 5. – С. 101-110.
19. Тугушева Ф.А., Зубина И.М., Митрофанова О.В. Оксидативный стресс и хроническая болезнь почек // Нефрология. – 2007. – **11**, № 3. – С. 29-47.
20. An W.S., Kim S.E., Kim K.H. et al. Association between oxidized LDL to LDL-ratio, HDL and vascular calcification in the feet of hemodialysis patients // J. Korean Med. Sci. – 2009. – **24** (Suppl. 1). – P. 115-120.
21. Cote C., Pibarot P., Despres J.P. et al. Association between circulating oxidized low-density lipoprotein and fibrocalcific remodeling of the aortic valve in aortic stenosis // Heart. – 2008. – **94**, № 9. – P. 1175-1180.
22. Dzgoeva F.U., Gatagonova T.M., Dzugkoeva F.S. et al. Role of free radical oxidation in the development of cardiovascular events in chronic renal failure // Ter. Arkh. – 2010. – **82**, № 1. – P. 51-56.
23. Gocmen A.Y., Sahin E., Semiz E., Gumuslu S. Is elevated serum ceruloplasmin level associated with increased risk of coronary artery disease? // Can. J. Cardiol. – 2008. – **24**, № 3. – P. 209-212.
24. Krasniak A., Drozd M., Pasowicz M. Factors involved in vascular calcification and atherosclerosis in maintenance haemodialysis patients // Nephrol. Dial. Transplant. – 2007. – **22**, № 2. – P. 515-521.
25. Leskinen Y., Paana T., Saha H. et al. Valvular calcification and its relationship to atherosclerosis in chronic kidney disease // J. Heart Valve Dis. – 2009. – **18**, № 4. – P. 429-438.
26. Mody N., Parhami F., Sarafian T.A., Demer L.L. Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells // Free Radic. Biol. Med. – 2001. – **31**, № 4. – P. 509-519.
27. Nishida J., Maeda T., Yuda S. et al. Massive cerebral embolism originated from ruptured infective mitral annular calcification in a chronic hemodialysis patient // Echocardiography. – 2009. – **26**, № 1. – P. 107-108.
28. Podolec P., Kopec G., Rubis P. et al. Calcific and degenerative aortic stenosis—pathogenesis and new possibilities of treatment // Przegl. Lek. – 2004. – **61**, № 6. – P. 604-608.
29. Rufino M., Garcia S., Jimenes A. et al. Heart valve calcification and calcium x phosphorus product in hemodialysis patient: analysis of optimum values for its prevention // Kidney Int. Suppl. – 2003. – **85**. – P. 115-118.
30. Zalba G., Fortuno A., San Jose G. et al. Oxidative stress, endothelial dysfunction and cerebrovascular disease // Cerebrovasc. Dis. – 2007. – **24** (Suppl. 1). – P. 24-29.

ЛИПИДНЫЙ ПРОФИЛЬ И СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЙ ГОМЕОСТАЗ У ДОДИАЛИЗНЫХ ПАЦИЕНТОВ С КАЛЬЦИНОЗОМ КЛАПАНОВ СЕРДЦА

Резюме

Изучена динамика показателей липидного профиля и прооксидантно-антиоксидантной системы у додиализных больных с кальцинозом клапанов сердца. Установлено, что кальцификация клапанного аппарата сердца в условиях додиализной стадии хронической болезни почек сочетается с развитием оксидативного стресса при незначимых нарушениях липидного гомеостаза. Сделан вывод о целесообразности применения средств, проявляющих нормализующее влияние на уровень липидной пероксидации и антиоксидантное состояние у додиализных пациентов с клапанным кальцинозом.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: хроническая болезнь почек, додиализная стадия, кальциноз клапанов сердца, оксидативный стресс, липидный обмен.

O.B. Susla

I.YA. HORBACHEVSKY TERNOPII STATE MEDICAL UNIVERSITY

LIPID PROFILE AND FREE RADICAL HOMEOSTASIS IN PREDIALYSIS PATIENTS WITH CARDIAC VALVE CALCINOSIS

Summary

A study has been conducted on dynamics of indices of lipid profile and prooxidative and antioxidant system in predialysis patients with cardiac valve calcinosis. It has been proved that a calcification of the heart valvular apparatus in the conditions of the predialysis stage of chronic kidney disease combines with the development of oxidative stress while insignificant changes of lipid homeostasis. A conclusion has been made as to the practicability of usage of means with normalizing influence on the level of lipid peroxidation and antioxidative condition in predialysis patients with valvular calcinosis.

KEY WORDS: chronic kidney disease, predialysis stage, cardiac valve calcinosis, oxidative stress, lipid metabolism.

Отримано 06.11.10

Адреса для листування: О.Б. Сусла, вул. Руська, 18/13, Тернопіль, 46008, Україна.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН НИРОК ЩУРІВ ЗА УМОВ ГОСТРОЇ МЕТІОНІНОВОЇ ГІПЕРГОМОЦИСТЕЇНЕМІЇ: ЗВ'ЯЗОК З АКТИВНІСТЮ ЕНЗИМІВ МЕТАБОЛІЗМУ СІРКОВМІСНИХ АМІНОКИСЛОТ В НИРКАХ

Досліджено вплив гострої метіонінової гіпергомоцистеїнемії (ГГЦ) на активність ензимних систем метаболізму сірковмісних амінокислот у нирках та показники функціонального стану нирок. Встановлено, що одноразове введення метіоніну викликає підвищення вмісту гомоцистеїну (ГЦ), цистеїну та зниження рівня гідроген сульфід у сироватці крові. При цьому в нирках реєстрували зростання активності ензимів транссульфування та утворення гідроген сульфід, зменшення активності ензимів метилування і зміни фосфоліпідного спектра. Розлади метаболізму ГЦ у нирках, що виникають за умов гострої ГГЦ, супроводжуються виключно пошкодженням тубулярного апарату нирок.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: гомоцистеїн, цистеїн, гідроген сульфід, ензими, нирки.

ВСТУП. В останні роки накопичились численні факти про причетність порушень метаболізму сірковмісних амінокислот, зокрема гіпергомоцистеїнемії (ГГЦ), до розвитку ниркової недостатності [5, 17]. На сьогодні не існує єдиної думки щодо типу уражень видільних органів, які виникають внаслідок цього патологічного стану. В літературі є дані про те, що ГГЦ викликає лише гломерулярні пошкодження нирок [18], тубулярні розлади [19] або обидва типи уражень [6]. Нещодавно було показано, що ГГЦ є не тільки фактором ризику виникнення ниркової патології, але і важливим чинником прогресування ниркової недостатності. Встановлено позитивну кореляцію між вмістом гомоцистеїну (ГЦ) у сироватці крові та розвитком кардіоваскулярних ускладнень у хворих з порушенням функцій нирок [7, 8].

Таким чином, причетність порушень обміну сірковмісних амінокислот до розвитку патології нирок не викликає сумнівів, однак механізми, через які ГГЦ реалізує токсичну дію щодо нирок, залишаються нез'ясованими.

Нині відомо, що в процесі метилування гомоцистеїну відбувається синтез метильованих сполук (креатину, холіну, адреналіну та ін.), а також утворення регулятора судинного тону – аденозину [5]. Поряд із цим, у процесах транссульфування проходить утилізація ГЦ до цистеїну та, водночас, синтезується гідроген сульфід (H₂S) – потужний вазодилататор [15, 16].

Можливо, певну роль у розвитку нефропатії, індукованої надлишком ГЦ, відіграють пертурбації ГЦ-метаболізуючих ензимних систем, що виникають за умов ГГЦ.

Отже, вищенаведені дані свідчать про необхідність більш детального вивчення метаболізму сірковмісних амінокислот в нирках за ГГЦ і його зв'язку з функціональним станом нирок. Тому метою цього дослідження було оцінити активність ензимних систем метаболізму ГЦ в нирках та функціональний стан нирок за умов гострої метіонінової ГГЦ.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди виконано на 20 білих безпородних щурах-самцях масою 200-250 г, яких утримували на стандартній крохмально-казеїновій дієті, з водним режимом *ad libitum* та 12-годинним світловим режимом день/ніч. Гостру ГГЦ індукували у 10 тварин шляхом одноразового інтрагастрального введення 5 % водного розчину L-метіоніну в дозі 500 мг/кг. Контрольну групу склали 10 інтактних щурів, яким в день експерименту замість 5 % розчину L-метіоніну інтрагастрально вводили аналогічну кількість питної води. Через 2 год після введення метіоніну, коли рівень ГЦ у крові сягає максимуму [1], тварин декапітували під легким ефірним наркозом. Досліди виконували згідно з правилами гуманного ставлення до експериментальних тварин, затвердженими комітетом з біоетики Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова.

Нирки перфузували холодним 1,15 % розчином калію хлориду, гомогенізували при 3000 об./хв (тефлон-скло) в середовищі 1,15 % калію хлориду у співвідношенні 1:4. Гомогенати органів центрифугували при 600 g та 4 °C упродовж 30 хв для отримання пост'ядерного супернатанту.

Загальний рівень ГЦ у сироватці крові визначали імуноферментним методом з використанням комерційного набору фірми "Axis-Shield" (Англія); загальний вміст цистеїну – за методом Gaitonde [11]; вміст H_2S в сироватці крові – спектрофотометричним методом [2]; вміст креатиніну в сироватці крові та сечі – за методом Яффе із застосуванням стандартних наборів фірми "Філісіт-Діагностика" (Україна); рівень натрію в сироватці крові та сечі – спектрофотометричним методом з використанням стандартного набору фірми "Філісіт-Діагностика" (Україна); активність γ -глутамілтрансферази (γ -глутамілтранспептидази) (КФ 2.3.2.2) в сечі оцінювали за швидкістю вивільнення 4-нітроаніліну з γ -глутамілнітроаніліду із застосуванням стандартного набору фірми "Філісіт-Діагностика" (Україна).

Фосфоліпідний спектр визначали методом тонкошарової хроматографії на силікагелі Л5/40, використовуючи систему розчинників хлороформ–метанол–вода у співвідношенні 65:30:5 (за об'ємом). Ідентифікацію індивідуальних фосфоліпідів після їх хроматографічного розділення проводили методом свідків, за допомогою якісних реакцій на холін, етаноламін та за величинами R_f , відомими з літератури [3].

Активність H_2S -синтезувальних ферментів – цистатіонін- β -синтази (ЦБС, КФ 4.2.1.22), цистатіонін- γ -ліази (ЦГЛ, КФ 4.4.1.1), цистеїнамінотрансферази (ЦАТ, КФ 2.6.1.3), тіосульфатдітіолсульфідтрансферази (ТДСТ, КФ 2.8.1.5) визначали, як описано [4]. Цистатіоназну активність цистатіонін- γ -ліази визначали за утворенням цистеїну в реакції розщеплення цистатіоніну [13], а цистатіонінсинтазну активність цистатіонін- β -синтази – за утворенням

цистатіоніну в реакції конденсації гомоцистеїну із серином [12]. S-аденозилгомоцистеїнгідролазну активність (АГГ, КФ 3.3.1.1) визначали в реакції гідролізу S-аденозилгомоцистеїну за приростом сульфгідрильних груп [14], активність метіонінаденозилтрансферази (МАТ, КФ 2.5.1.6) – за приростом неорганічного фосфату [9], а бетаїногмоцистеїнметилтрансферази (БГМТ, КФ 2.1.1.5) – за зменшенням сульфгідрильних груп [10].

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою стандартних статистичних програм "MS Excel XP". Оцінювали середнє значення, стандартні помилки, достовірність відмінностей за t-критерієм Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Одноразове введення 5 % розчину метіоніну щурам викликало дисбаланс в обміні сірковмісних амінокислот (табл. 1): в сироватці крові значно зростав вміст ГЦ (у 4,6 раза), помірно підвищувався вміст цистеїну (на 11,7 %) і знижувався (на 40,4 %) вміст гідроген сульфід. З метою визначення ролі ГЦ у формуванні дефіциту H_2S в сироватці крові ми оцінили співвідношення між рівнем H_2S та вмістом ГЦ. У контрольних тварин співвідношення H_2S /ГЦ складало $13,4 \pm 0,95$, тоді як у щурів з метіоніновою ГГЦ воно було у 7,5 раза меншим. Можливо, саме надлишок ГЦ є одним із чинників формування дефіциту H_2S .

Гостра метіонінова ГГЦ супроводжувалась зміною продукції H_2S в нирках. Зміни активності ферментів-продуцентів H_2S в гомогенаті нирок були повністю протилежними до змін вмісту H_2S в сироватці крові щурів. За даними таблиці 2, одноразове введення метіоніну через 2 год викликало достовірне зростання активності ЦГЛ, ЦБС та ТДСТ на 49,4, 39,4 та 23,7% відповідно. Натомість, активність ЦАТ підвищувалась лише на рівні тенденції.

Навантаження щурів метіоніном викликало пертурбації в ферментних системах транссульфування та метилування ГЦ (табл. 2). Виявле-

Таблиця 1 – Вплив гострої ГГЦ на вміст цистеїну, гомоцистеїну та гідроген сульфід у сироватці крові щурів ($M \pm m$, $n=10$)

Показник	Група тварин	
	контроль	гостра ГГЦ
Сироватка крові		
Цистеїн, мкмоль/л	$120 \pm 3,88$	$134 \pm 4,27^*$
Гомоцистеїн, мкмоль/л	$6,52 \pm 0,32$	$29,9 \pm 1,62^*$
Гідроген сульфід, мкмоль/л	$86,1 \pm 4,97$	$51,3 \pm 6,15^*$
Гідроген сульфід/гомоцистеїн	$13,4 \pm 0,95$	$1,79 \pm 0,26^*$

Примітка. Тут і в наступних таблицях: * – достовірність відмінностей ($p < 0,05$) відносно контролю.

Таблиця 2 – Вплив гострої ГГЦ на активність ензимів метилування, транссульфування, утворення H₂S та вміст фосфоліпідів у пост'ядерних гомогенатах нирок щурів (M±m, n=10)

Показник	Група тварин	
	контроль	гостра ГГЦ
Активність ензимів, нмоль/хв на 1 мг протеїну		
ЦГЛ (утворення H ₂ S)	1,74±0,21	2,60±0,18*
ЦБС (утворення H ₂ S)	2,26±0,26	3,15±0,22*
ЦАТ (утворення H ₂ S)	2,56±0,32	2,80±0,20
ТДСТ (утворення H ₂ S)	3,42±0,07	4,23±0,11*
ЦГЛ (розщеплення цистатіоніну)	15,4±0,34	17,1±0,49*
ЦБС (синтез цистатіоніну)	15,2±0,54	17,6±0,82*
Бетаїнгомоцистеїнметилтрансфераза	2,44±0,08	1,96±0,12*
Метіонаденозилтрансфераза	3,05±0,15	3,80±0,30*
Аденозилгомоцистеїнгідролаза	5,02±0,49	3,70±0,16*
Вміст фосфоліпідів, мкг/мг протеїну		
Лізофосфатидилхолін	2,76±0,15	5,81±0,32*
Фосфатидилхолін	62,7±2,99	54,6±2,43*
Фосфатидилетаноламін	55,3±2,86	64,2±2,92*
Фосфатидилхолін/фосфатидилетаноламін	1,15±0,06	0,87±0,06*

но, що за умов гострої ГГЦ цистатіонінсинтаза на активність ЦБС зростала на 15,8 %, а цистатіоназна активність ЦГЛ – на 11,0 %. Разом із тим ГГЦ мала різноспрямований вплив на активність ензимів метилування. Зокрема, активність БГМТ та АГГ достовірно знижувалась на 19,7 та 26,3 % відповідно, а активність МАТ зростала на 24,6 %. Порушення активності ензимів метилування за цих умов супроводжувались змінами фосфоліпідного спектра нирок. У щурів з метіоніновою ГГЦ зменшувався абсолютний вміст ФХ на 12,9 %, збільшувалась кількість ФЕ на 16,1 %, знижувалось співвідношення ФХ до ФЕ в 1,3 раза, що є доказом пригнічення процесів метилування в нирках. За цих умов зростав вміст лізофосфатидилхоліну (ЛФХ) на 111 %, що свідчить про значне окиснювальне ураження клітинних мембран нирок.

У наступній частині роботи ми оцінили вплив гострої ГГЦ на показники функціонального стану нирок (табл. 3). Одноразове введення метіоніну практично не впливало на показники фільтраційної та реабсорбційної здатності нирок у щурів. Проте за цих умов виникали ознаки тубулотоксичності, про що доказово свідчить зростання екскреції протеїну з сечею на 53,6 % та активності ГГТП на 62,2 %.

Проведений кореляційний аналіз показав, що в контрольній групі щурів активність ГГТП у сечі помірно корелювала з вмістом сірковмісних метаболітів та фосфоліпідів у нирках, проте зв'язки не досягали статистично достовірних

меж. За умов гострої метіонінової ГГЦ виникали тісні достовірні кореляційні зв'язки з вмістом ГЦ ($r=0,71$, $p<0,05$), цистеїну в сироватці крові ($r=0,62$, $p<0,05$), рівнем ЛФХ ($r=0,68$, $p<0,05$) та активністю ЦБС у нирках ($r=+0,59$, $p<0,05$). Зокрема, зростання активності ГГТП у сечі асоціювалось зі збільшенням вмісту ГЦ, цистеїну в сироватці крові, підвищенням рівня ЛФХ та активності ЦБС у нирках.

Таким чином гостра метіонінова ГГЦ викликає зростання рівня ГЦ та цистеїну в сироватці крові. Цілком очевидно, що такі зміни вмісту сірковмісних амінокислот є наслідком порушення процесів реметилування та транссульфування. В наших дослідженнях показано, що за умов гострої метіонінової ГГЦ спостерігаються депресія ензиму реметилування ГЦ до метіоніну – БГМТ та зростання активності ензимів транссульфування ГЦ до цистеїну – ЦГЛ та ЦБС. Постає питання щодо чинників, які виникають за гострої ГГЦ і викликають зміну активності ензимів утилізації ГЦ. Відомо, що важливим регулятором обміну ГЦ є S-аденозилметіонін, який активує ЦБС та, водночас, інгібує БГМТ. Основним постачальником цього біорегулятора в клітинах нирок є ензиматична реакція, каталізована МАТ [3]. Нами встановлено, що за умов одноразового навантаження метіоніном активність МАТ в нирках достовірно зростає. Отже, за умов метіонінової ГГЦ створюються умови для накопичення S-аденозилметіоніну, що, ймовірно, і є причиною зафіксованих нами пертурбацій в основних шляхах метаболізму ГЦ.

Таблиця 3 – Вплив гострої ГГЦ на показники функціонування нирок щурів ($M \pm m$, $n=10$)

Показник	Група тварин	
	контроль	гостра ГГЦ
Натрій сироватки, ммоль/л	133±3,95	141±5,64
Креатинін сироватки, мкмоль/л	86,04±2,19	90,17±5,05
Натрій сечі, ммоль/л	204±6,44	195±10,14
Креатинін сечі, ммоль/л	6,98±0,30	6,72±0,23
Кліренс креатиніну, мл/хв	0,92±0,05	0,83±0,06
Коефіцієнт реабсорбції води, %	98,8±0,05	98,6±0,10
Протеїн сечі, мг/мл	5,54±0,32	8,51±0,48*
Активність ГГТП у сечі, нмоль/хв·мл	0,90±0,03	1,46±0,06*

Одноразове введення метіоніну супроводжується пригніченням активності реакцій трансметилування, про що доказово свідчить збільшення вмісту неметильованого фосфоліпиду – ФЕ при одночасному зниженні рівня метильованого фосфоліпиду – ФХ у нирках, а також посилення процесів пероксидації ліпідів, оскільки за цих умов рееструють зростання ЛФХ у нирках. Активація ліпопероксидації за гострої ГГЦ, імовірно, є наслідком зростання вмісту ГЦ та цистеїну, які проявляють прооксидантну дію [3]. Разом із тим, причиною порушення процесів метилування за ГГЦ є накопичення в нирках S-аденозилгомоцистеїну – відомого інгібітора реакцій трансметилування. За даними літератури, ефективно усунення надлишку цього інгібітора забезпечується в реакції, каталізованій АГГ [3]. Нами було показано, що при гострій метіоніновій ГГЦ зменшується активність цього ензиму, що, ймовірно, сповільнює деградацію S-аденозилгомоцистеїну і може бути причиною зниження активності метилтрансфераз.

Ще одним негативним ефектом ГГЦ на організм є формування дефіциту H_2S в сироватці крові. Встановлено, що ГГЦ, викликана одноразовим введенням метіоніну, спричиняє достовірне зниження вмісту H_2S в сироватці крові та супроводжується статистично вірогідним підвищенням активності ензимів, які каталізують його утворення в нирках, – ЦГЛ, ЦБС, ТДСТ. Можна помітити певну неузгодженість: зростання активності ензимів, що каталізують продукцію цієї вазоактивної молекули в нирках, супроводжується зменшенням рівня H_2S в крові. Можливо, це пов'язано з відносною відокремленістю пулів H_2S в нирках та крові. Ще однією причиною зниження рівня даної вазоактивної молекули в крові може бути переважання процесів її деградації над проце-

сами синтезу, адже відомо, що H_2S є короткоживучою молекулою і легко руйнується активними формами кисню [16].

Порушення активності ензимних систем метаболізму ГЦ у нирках, індуковані гострою ГГЦ, супроводжуються зміною функціонального стану даних видільних органів. Причому за цих умов спостерігаються виключно тубулярні пошкодження, про що свідчить достовірне зростання активності ГГТП та вмісту білка в сечі. Проведений кореляційний аналіз дозволив уточнити, які саме патогенетичні чинники, що з'являються при ГГЦ, найбільшою мірою асоціюються зі змінами функціонального стану нирок. Було виявлено, що за гострої ГГЦ такими факторами є підвищення рівня ГЦ, цистеїну та активація оксидативного стресу в нирках.

ВИСНОВКИ. 1. Одноразове введення шурам метіоніну викликає формування дисбалансу сірковмісних сполук в сироватці крові: зростає рівень ГЦ (в 4,6 раза) та цистеїну (на 11,7 %) і одночасно знижується вміст H_2S (на 40,4 %).

2. За умов гострої метіонінової ГГЦ у нирках щурів зростає активність ензимів транссульфування та синтезу H_2S – ЦГЛ (на 11,0-49,4 %), ЦБС (на 15,8-39,4 %), ТДСТ (на 23,7 %) та знижується активність ензимів циклу метилування – БГМТ (на 19,7 %), АГГ (на 26,3 %), що супроводжується порушенням фосфоліпідного спектра нирок щурів.

3. ГГЦ-індукована нефропатія за умов гострої ГГЦ проявляється виключно тубулярними пошкодженнями (активність ГГТП у сечі зростає на 60-65 %, а екскреція білка – на 50-55 %). При цьому маркери токсичного ураження каналців нирок тісно корелюють з рівнем ГЦ, цистеїну в сироватці крові, вмістом лізофосфатидилхоліну та активністю ЦБС у нирках.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Артемчук М. А. Профілактично-лікувальна дія вітамінних та вітамінно-мікроелементних препаратів за гострої та хронічної метіонінової гіпергомоцистеїнемії / М. А. Артемчук // *Biomedical and Biosocial Anthropology*. – 2006. – № 7. – С. 17–20.
2. Визначення вмісту гідроген сульфід у сироватці крові / Н. В. Заїчко, Н. О. Пентюк, Л. О. Пентюк, А. В. Мельник // *Вісник наукових досліджень*. – 2009. – № 1. – С. 29–32.
3. Кейтс М. Техника липидологии / М. Кейтс. – М.: Мир, 1975. – С. 126–135.
4. Мельник А. В. Активність ензимів синтезу гідроген сульфід у нирках щурів / А. В. Мельник, О. О. Пентюк // *Укр. біохім. журн.* – 2009. – **81**, № 4. – С. 12–22.
5. Метаболізм гомоцистеїну та його роль у патології / О. О. Пентюк, М. Б. Луцюк, І. І. Андрушко, К. П. Поставітенко // *Укр. біохім. журн.* – 2003. – **75**, № 1. – С. 5–17.
6. Поставітенко К. П. Гіпергомоцистеїнемія у хворих з хронічною нирковою недостатністю: зв'язок з ураженням серцево-судинної системи, вітамінним статусом та дисліпідемією (клініко-експериментальне дослідження): автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук: спец. 14.01.02 "Внутрішні хвороби" / К. П. Поставітенко. – К., 2006. – 22 с.
7. Семидоцкая Ж. Д. Влияние гипергомоцистеинемии, дислипидопротеидемии и эндотелиальной дисфункции на развитие сердечно-сосудистых осложнений при хронической почечной недостаточности / Ж. Д. Семидоцкая, А. В. Сиваш, А. В. Кудря // *Врач. практика*. – 2003. – № 2. – С. 31–34.
8. Сиваш О. В. Гіпергомоцистеїнемія як фактор ризику розвитку серцево-судинних ускладнень у хворих на хронічний гломерулонефрит / О. В. Сиваш // *Атеросклероз та атеротромбоз: патогенез, клініка, лікування: Всеукр. наук.-практ. конф., 16-17 жовт. 2003 р.: тези доп.* – Харків, 2003. – С. 100.
9. Chiang P. K. Activation of methionine for transmethylation. Purification of the S-adenosylmethionine synthetase of bakers' yeast and its separation into two forms / P. K. Chiang, G. L. Cantoni // *J. Biol. Chem.* – 1977. – **252**, № 13. – P. 4506–4513.
10. Ericson L. E. Betaine-homocysteine methyltransferases. III. The methyl donor specificity of the transferase isolated from pig liver / L. E. Ericson // *Acta. Chem. Scand.* – 1960. – **14**. – P. 2127–2134.
11. Gaitonde M. K. A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acids / M. K. Gaitonde // *Biochem. J.* – 1967. – **104**, № 2. – P. 627–633.
12. Goldstein J. L. Cystathionine synthase activity in human lymphocytes: induction by phytohemagglutinin / J. L. Goldstein, B. K. Campbell, S. M. Gartler // *J. Clin. Invest.* – 1972. – **51**, № 4. – P. 1034–1037.
13. Heinonen K. Studies on cystathionase activity in rat liver and brain during development. Effects of hormones and amino acids in vivo / K. Heinonen // *Biochem. J.* – 1973. – **136**, № 4. – P. 1011–1015.
14. Isa Y. Effect of vitamin B6 deficiency on S-adenosylhomocysteine hydrolase activity as a target point for methionine metabolic regulation / Y. Isa, H. Tsuge, T. Hayakawa // *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* – 2006. – **52**, № 5. – P. 302–306.
15. Kimura Y., Goto Y., Kimura H. Hydrogen sulfide increases glutathione production and suppresses oxidative stress in mitochondria / Y. Kimura, Y. Goto, H. Kimura // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2010. – **12**, № 1. – P. 1–13.
16. Lowicka E. Hydrogen sulfide (H₂S) – the third gas of interest for pharmacologists / E. Lowicka, J. Beltowski // *Pharmacological Reports*. – 2007. – **59**. – P. 4–24.
17. The Hordaland Homocysteine Study: a community-based study of homocysteine, its determinants, and associations with disease / H. Refsum, E. Nurk, A. D. Smith [et al.] // *J. Nutr.* – 2006. – **136**. – P. 1731–1740.
18. van Guldener C. Why is homocysteine elevated in renal failure and what can be expected from homocysteine-lowering? / C. van Guldener // *Nephrology Dialysis Transplantation*. – 2006. – **21**, № 5. – P. 1161–1166.
19. Yi F. Mechanisms of homocysteine-induced glomerular injury and sclerosis / F. Yi, P. L. Li // *Am. J. Nephrol.* – 2008. **28**, № 2. – P. 254–264.

А.В. Мельник, С.О. Качула

ВИННИЦКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.И. ПИРОГОВА

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПОЧЕК КРЫС ПРИ ОСТРОЙ МЕТИОНИНОВОЙ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ: СВЯЗЬ С АКТИВНОСТЬЮ ЭНЗИМОВ МЕТАБОЛИЗМА СЕРОСОДЕРЖАЩИХ АМИНОКИСЛОТ В ПОЧКАХ

Резюме

Исследовано влияние острой метиониновой гипергомоцистеинемии (ГГЦ) на активность энзимных систем метаболизма серосодержащих аминокислот в почках и показатели функционального состояния почек. Уста-

новлено, что однократное введение метионина вызывает повышение содержания гомоцистеина (ГЦ), цистеина и снижение уровня гидроген сульфида в сыворотке крови. При этом в почках регистрировали возрастание активности энзимов транссульфурирования и образования гидроген сульфида, уменьшение активности энзимов метилирования и изменения фосфолипидного спектра. Нарушения метаболизма ГЦ в почках, которые возникают при острой ГГЦ, сопровождаются исключительно повреждением тубулярного аппарата почек.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гомоцистеин, цистеин, гидроген сульфид, энзимы, почки.

A.V. Melnyk, S.O. Kachula

VINNYTSIA NATIONAL PYROHOV MEMORIAL MEDICAL UNIVERSITY

FUNCTIONAL CONDITION OF RATS KIDNEYS AT ACUTE METHIONINE HYPERHOMOCYSTEINEMIA: CONNECTION WITH ACTIVITY OF SULFUR-CONTAINING AMINO ACIDS METABOLISING ENZYMES IN KIDNEYS

Summary

Influence of the acute methionine hyperhomocysteinemia (HHc) on activities of sulfur-containing amino acids metabolising enzymes in kidneys and indices of the functional condition of kidneys has been investigated. It has been established, that single introduction of methionine causes the increase of blood levels of homocysteine (Hcy) and cysteine, but decrease of hydrogen sulfide content. Thus increase of activity of trans-sulfuration enzymes and hydrogen sulfide synthesis, decrease of activity of methylation enzymes and change of phospholipids spectrum in kidneys has been registered. Metabolic imbalances of Hcy in kidneys which develop by acute HHcy, are accompanied exclusively by damages of kidney's tubular apparatus.

KEY WORDS: **homocysteine, cysteine, hydrogen sulfide, enzymes, kidneys.**

Отримано 04.11.10

Адреса для листування: А.В. Мельник, Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова, вул. Пирогова, 56, Вінниця, 21018, Україна.

ОБМІН ГЛУТАТІОНУ ТА АКТИВНІСТЬ АНТИОКСИДАНТНИХ ФЕРМЕНТІВ У ТКАНИНАХ ЩУРІВ, ДЕФІЦИТНИХ НА ВІТАМІН Е

У роботі наведено результати досліджень обміну глутатіону та активності антиоксидантної системи щурів за умов дефіциту токоферолу ацетату. Встановлено, що за даних умов посилюється використання глутатіону, підвищується активність супероксиддисмутази і гамма-глутатіонтрансферази та знижується – глутатіонзалежних ферментів і каталази. Результати показали вибіркового характеру реакцій антиоксидантної системи організму щурів при дефіциті одного з антиоксидантних факторів – вітаміну Е, а також комплекс взаємодій між окремими учасниками цієї системи. Доведено, що для нормального функціонування антиоксидантного захисту організму і синтезу гемму необхідна достатня кількість токоферолу ацетату.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: токоферолу ацетат, глутатіон, супероксиддисмутаза, каталаза.

ВСТУП. Ми займаємося вивченням умов та механізмів розвитку порушень порфіринового обміну. Як одна зі складових даної проблеми нас зацікавив токоферолу ацетат, оскільки, за даними літератури, вітамін Е, з одного боку, є одним із регуляторів синтезу гемму, а з іншого – здатен, як і відновлений глутатіон (GSH), взаємодіяти з активними формами кисню і вільними радикалами та відновлювати їх. Таким чином, він попереджує подальше руйнування антиоксидантного захисту організму та перешкоджає гіпоксії [4]. Цікавість до цього дослідження визначається ще і тим, що за своєю хімічною будовою майже всі найважливіші біологічні переносники кисню – дихальні пігменти і ферменти (гемоглобін, міоглобін, цитохроми, цитохромоксидаза, каталаза, пероксидаза та ін.), як і хлорофіл зеленого листя рослин, являють собою складні специфічні білкові структури, до складу простетичної групи яких входять порфірини в комплексному поєднанні з металами [10]. Порфірини є кінцевим предметом наших досліджень.

Мета роботи – вивчення впливу аліментарного дефіциту вітаміну Е на рівень відновленого глутатіону, цистеїну, активність глутатіонзалежних ферментів, супероксиддисмутази і каталази в органах щурів.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Експерименти проведено на 40 нелінійних білих щурах масою 200-220 г. Дефіцит вітаміну Е викликали шляхом призначення напівсинтетичної дієти, збалансованої за всіма нутрієнтами, але обмеженої щодо вітаміну Е. Групу тварин (дослі-

ди з відновлення дефіциту вітаміну Е) в останні 2 тижні перевели на повноцінний раціон харчування. Контрольні щури (20 тварин) отримували їжу з додаванням 150 мкг/кг токоферолу ацетату [8]. Розвиток дефіциту вітаміну Е контролювали шляхом визначення ступеня гемолізу еритроцитів, кількості вільного токоферолу в плазмі крові та перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) печінки [4, 5, 7]. Після декапітації тварин під ефірним наркозом печінку, легені й серце перфузували 0,154 М розчином KCl та гомогенізували. Гомогенати зберігали в рідкому азоті. Після швидкого розморожування їх центрифугували для визначення активності супероксиддисмутази (СОД), глутатіонпероксидази (ГП), глутатіонредуктази (ГР), каталази (КТ), гамма-глутатіонтрансферази (ГГТ), глутатіон-S-трансферази (ГТ) із субстратами 1-хлор-2,4-динітробензол (ХДНБ) та нітрогліцерином (НГ). Активність ферментів GSH, GSSG (глутатіондисульфід) і цистеїну у тканинах визначали за стандартними методиками [1, 12].

Усі маніпуляції на тваринах проводили під етамінал-натрієвим наркозом (60 мг/кг підшкірно) згідно з міжнародними принципами Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 18.03.1986) [3].

Статистичну обробку даних проводили за використанням параметричних методів статистики за t-критерієм Стьюдента [2, 6].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. У щурів, які 2 тижні перебували на раціоні, обмеженому щодо вітаміну Е, спостерігали розвиток його

недостатності: зменшувалась кількість токоферолу ацетату в плазмі крові, при цьому підвищувалася активність гемолізу еритроцитів та ПОЛ у печінці (табл. 1). Переведення тварин на повноцінний раціон харчування привів до нормалізації рівня токоферолу ацетату, активності ПОЛ, значного зменшення активності гемолізу еритроцитів. У печінці та легенях, дефіцитних на вітамін Е, знижувалась кількість GSH та не змінювалась кількість цистеїну. Відновлення після дефіциту вітаміну Е значною мірою нормалізувало ці показники, що

підтвердило ще раз дані літератури про те, що GSH і токоферолу ацетат здатні взаємодіяти з активними формами кисню і вільними радикалами, відновлюючи їх і, таким чином, попереджуючи порушення антиоксидантної системи організму [8, 9]. Як наслідок, зниження концентрації GSH і токоферолу ацетату в тканинах щурів, дефіцитних на вітамін Е, пов'язане з посиленням їх витрачанням для компенсування недостатності токоферолу ацетату. Активність ГР та ГП у печінці тварин суттєво не змінювалась і тільки в серці трохи знижувалась. Нако-

Таблиця 1 – Рівень GSH, GSSG, цистеїну та активність ферментів і ПОЛ в органах вітамін Е-дефіцитних щурів (M±m)

Показник	Одиниця виміру	Орган	Контроль	Дефіцит	Дефіцит вітаміну Е
Спонтанний гемоліз	ум. од.	–	5,14±0,58	84,4±2,20*	12,5±0,89*
Токоферол плазми крові	мг/л	–	9,98±0,33	1,44±0,11*	11,8±0,98
GSH	ммоль/г	печінка	7,23±0,15	5,17±0,16*	6,05±0,18*
GSSG	ммоль/г	печінка	0,52±0,05	1,50±0,60*	1,06±0,09*
		легені	0,064±0,005	0,072±0,007	0,072±0,006
ГП	ммоль/хв/мг білка	печінка	0,09±0,011	0,09±0,010	0,08±0,011
		серце	0,10±0,003	0,07±0,006*	0,08±0,035
ГР	ммоль/хв/мг білка	печінка	0,068±0,007	0,049±0,004*	0,057±0,002
		легені	0,022±0,001	0,018±0,0008*	0,020±0,002
Цистеїн	ммоль/г	печінка	0,22±0,015	0,22±0,008	0,23±0,015
		легені	0,064±0,005	0,072±0,007	0,072±0,006
ГГТ	наномоль/хв/мг білка	печінка	1,09±0,048	2,16±0,092*	1,52±0,0104*
		легені	3,35±0,16	3,86±0,21	3,53±0,39
КАТ	ум. од.	печінка	660±21	565±20*	665±52
		легені	18,2±1,7	23,8±1,9	20,2±2,0
СОД	ум. од.	печінка	57,7±5,87	88,5±5,62*	58,2±4,58
		серце	41,1±2,85	17,5±1,92*	36,0±2,61

Примітка. * – p<0,05 порівняно з контролем.

пичення GSSG у печінці щурів вірогідно пов'язане з порушенням його регенерації до GSH внаслідок зменшення ГР. Активність ГТ у печінці збільшувалась. Останній факт є вкрай важливим, оскільки ГГТ бере участь у роботі гамма-глутамільного циклу, що забезпечує синтез та розпад глутатіону, можна припустити, що за умов дефіциту вітаміну Е має місце посилення обороту глутатіону. Активність КТ у печінці щурів, дефіцитних на вітамін Е, дещо знижувалася, що можна пояснити з огляду на уявлення про вітамін Е як регулятор синтезу гемі [9, 11].

Активність СОД у печінці значно збільшувалася, що вочевидь, є компенсаторною реакцією у відповідь на зменшення антиоксидантної ролі вітаміну Е.

ВИСНОВКИ. 1. За умов дефіциту вітаміну Е мають місце адаптаційне посилення використання глутатіону, підвищення активності супероксиддисмутази і гамма-глутатіонтрансферази.

2. Активність глутатіонзалежних ферментів і каталази в тканинах щурів, дефіцитних на токоферолу ацетат, знижується. Характер регування антиоксидантної системи на недостатність токоферолу ацетату має вибіркового характеру.

3. Отримані дані в цілому свідчать про те, що для нормального функціонування антиоксидантного захисту організму і синтезу гемі необхідна присутність в організмі щурів достатньої кількості токоферолу ацетату.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Базарнова М.А., Гетте З.П., Кальнова Л.И. и др. Руководство по клинической лабораторной диагностике: Учеб. пособие / Под ред. М.А. Базарновой, В.Т. Морозовой. – 2-е изд., перераб. и доп. – К.: Вища шк., 2000. – Ч.3: Клиническая биохимия. – 319 с.
2. Зайцев В.М., Лифляндский В.Г., Маринкин В.И. Прикладная медицинская статистика. – СПб.: ФО-ЛИАНТ, 2003. – 429 с.
3. Кожемякин Ю.М., Хромов О.С., Філоненко М.А., Сайфетдінова Г.А. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними. – К.: Авіцена, 2002. – 156 с.
4. Писанец М.П., Джермакян А.В. Биосинтез порфиринов в эритроцитах у здоровых лиц различного пола и возраста // Проблемы гематологии и переливания крови. – 1980. – 25. – С. 44-46.
5. Плужников Н.Н., Тяптин А.А. Состояние антиоксидантной системы крови и легких крыс при токсическом отеке легких / Вопр. мед. химии. – 2000. – № 6. – С. 95-102.
6. Сернов Л.Н., Гацура В.В. Элементы экспериментальной фармакологии. – М., 2000. – С. 192.
7. Филипенко П.С., Титоренко М.В., Потапов Г.В. Изменение активности глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы и каталазы в плазме крови больных различными формами острого панкреатита // Современные наукоемкие технологии. – 2004. – № 3. – С. 94.
8. Экспериментальная витаминология: Справочное руководство / Под ред. Ю.М. Островского. – Минск: Наука и техника, 1979. – С. 5-57.
9. Anderson K.E., Sassa S., Bishop D.F., Desnick R.J. Disorders of heme biosynthesis: X-linked sideroblastic anemia and the porphyrias. In The molecular and metabolic bases of inherited disease. C.S. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, and D. Valle, editors. 8th edition. McGraw-Hill. – New York, 2001. – P. 2961-3062.
10. Desnick R.J., Astrin K.H. Congenital erythropoietic porphyria: advances in pathogenesis and treatment // Br. J. Haematol. Jun. – 2002. – 117 (4). – P. 779-795.
11. Eichbaum Q.G., Dzik W.H., Chung R.T., Szczepiorkowski Z.M. Red blood cell exchange transfusion in two patients with advanced erythropoietic protoporphyria // Transfusion. – 2005. – 45 (2). – P. 208-213.
12. Zaider E., Bickers D.R. Clinical laboratory methods for diagnosis of the porphyrias // Clin. Dermatol. – 1998. – 16 (2). – P. 277-293.

С.И. Крыжная

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

ОБМЕН ГЛУТАТИОНА И АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ В ТКАНЯХ КРЫС, ДЕФИЦИТНЫХ НА ВИТАМИН E

Резюме

В работе приведены результаты исследований обмена глутатиона и активности антиоксидантной системы крыс в условиях дефицита токоферола ацетата. Установлено, что в данных условиях усиливается использование глутатиона, повышается активность супероксиддисмутазы и гамма-глутатионтрансферазы, снижается – глутатионзависимых ферментов и каталазы. Результаты показали избирательный характер реакций антиоксидантной системы организма крыс при дефиците одного из антиоксидантных факторов – витамина E, а также комплекс взаимодействий между отдельными участниками этой системы. Доказано, что для нормального функционирования антиоксидантной защиты организма и синтеза гема необходимо достаточное количество токоферола ацетата.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: токоферола ацетат, глутатион, супероксиддисмутаза, каталаза.

S.I. Kryzhna

NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

EXCHANGE OF GLUTATHIONE AND THE ACTIVITY OF ANTIOXIDANT FERMENTS IN TISSUES OF RATS DUE TO DEFICIENCY OF THE VITAMIN E

Summary

There are shown the results of studies of glutathione exchange and the activity of the antioxidant system of rats due to deficiency of tocopherol acetate. It is established that it leads to increasing the use of glutathione, increased activity of superoxidisedismutase and gamma-glutationtransferase and it is lowered the glutation-depending ferments and catalase. Results have shown the selective nature of reactions of the antioxidant system rats' organism due to deficiency of the one anti-oxidation product factors - vitamin E, and it is also shown the complex of interactions between individual participants in this system. It is proved that for the normal functioning of the antioxidant protection of organism and synthesis of hem is necessary the enough of tocopherol acetate.

KEY WORDS: tocopherol acetate, glutathione, superoxidisedismutase, catalase.

Отримано 07.05.10

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

**СИНТЕЗ ТА БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ *b*-N-АЦИЛГІДРАЗИДІВ
4-КАРБЕТОКСИСУКЦИНАНІЛОВОЇ КИСЛОТИ**

Здійснено синтез *b*-N-ацилгідрозидів 4-карбетоксисукцинанілової кислоти, вивчено їх фізико-хімічні властивості. Будову синтезованих сполук підтверджено даними елементного аналізу та ІЧ-спектрів. Чистоту контролювали методом тонкошарової хроматографії. За програмою PASS проведено комп'ютерний прогноз можливих видів біологічної активності в перше синтезованих речовин серед *b*-N-ацилгідрозидів 4-карбетоксисукцинанілової кислоти. Експериментально встановлено, що синтезовані речовини проявляють проти-запальну, анальгетичну, протимікробну та протигрибкову активність. За класифікацією К.К. Сидорова, синтезовані речовини при внутрішньошлунковому введенні належать до класу малотоксичних або нетоксичних сполук ($DL_{50}=2500-6500$ мг/кг).

КЛЮЧОВІ СЛОВА: синтез, параамінобензойна та бурштинова кислоти, біологічна активність.

ВСТУП. Проблема розробки нових вітчизняних лікарських засобів і впровадження їх у медичну практику на сьогодні настільки актуальна й очевидна, що не потребує якогось особливого обґрунтування. Цікавими об'єктами в цьому відношенні є похідні *l*-амінобензойної кислоти, яка входить до складу 1,5 % лікарських препаратів. Одним із напрямків пошуку нових біологічно активних речовин є синтез сполук, які поєднують у своїй структурі декілька фармакофорів, що дозволяє модифікувати будову речовин і виявити ряд закономірностей зв'язку "хімічна структура-біологічна дія". Проведені раніше дослідження [2-7] серед похідних 4-карбетоксисукцинанілової (малонової) кислоти свідчать про їх різноманітну фармакологічну активність. На різних етапах доклінічного й клінічного досліджень перебувають три субстанції – оксаглюкамін, бензодіокс, оксидиглюкамін [3-7]. Дані обставини визначили необхідність подальшого розширення хімічного й фармакологічного вивчення раніше не досліджуваних *b*-N-ацилгідрозидів 4-карбетоксисукцинанілової кислоти.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Ацилгідрозиди 4-карбетоксисукцинанілової кислоти (рис. 1) синтезовано на кафедрі медичної хімії Націо-

нального фармацевтичного університету (зав. каф. проф. І.С. Гриценко). *b*-N-ацилгідрозиди 4-карбетоксисукцинанілової кислоти одержано двома способами: шляхом взаємодії гідрозиду 4-карбетоксисукцинанілової кислоти з хлорангідридами заміщених *o*-хлорбензойної кислоти за присутності піридину (спосіб А, вихід 85-92 %) та шляхом взаємодії N-іміду 4-карбетоксисукцинанілової кислоти з гідрозиди-

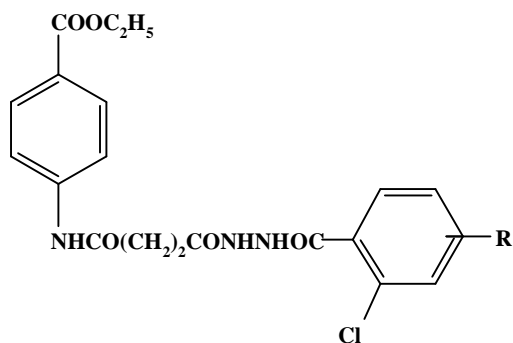


Рис. 1. *b*-N-ацилгідрозиди 4-карбетоксисукцинанілової кислоти.

дами заміщених *o*-хлорбензойної кислоти (спосіб Б, вихід 77-83 %). Синтезовані сполуки (I-VI) – білі або біло-жовті кристалічні речовини, які розчинні при нагріванні в спиртах, діоксані, ДМФА, важко – у воді. Будову та інди-

© С.Г. Ісаєв, З.Г. Єрьоміна, А.М. Семенов, І.А. Зупанець, Л.О. Булига, О.А. Бризицький, Н.П. Кобзар, 2010.

відуальність їх визначено даними елементно-го аналізу (автоматичний аналізатор M-185 фірми "Hewlett Packard"), ІЧ-спектроскопії (спектрофотометр "Specord M-80"), методом хроматографії у тонкому шарі сорбенту на пластинках "Silufol UV-254". Дані елементного аналізу (C,N,H) відповідають розрахованим. В ІЧ-спектрограмах сполук (I-VI) ідентифіковано смуги поглинання, що відповідають коливанням груп, cm^{-1} : 3362-3216 (n_{NH}), 1734-1722 ($n_{C=O}^{эф.}$), 1662-1648 ($n_{C=O}^{амід}$), 1604-1596 (n_{C-Ph}), 1578-1570 (d_{NH}), 1420-1408 (d_{CH_2}), 805-765 (n_{C-Cl}). В ІЧ-спектрах сполук (IV, V) у ділянках 1528-1525 та 1322-1320 cm^{-1} ідентифіковано смуги асиметричних та симетричних коливань нітрогрупи (табл. 1).

Для комп'ютерного прогнозу спектра біологічної активності *b*-N-ацилгідрозидів 4-карбетоксисукцинанілової кислоти нами використано комп'ютерну програму PASS [8, 9]. Протизапальну активність *b*-N-ацилгідрозидів 4-карбетоксисукцинанілової кислоти (I-VI) вивчали на моделі карагенінового набряку [1] на мишах у дозах 10 та 20 мг/кг. Препаратом порівняння обрано диклофенак натрію. Анальгетичну дію вивчали на білих безпородних щурах на моделі гарячої пластини [1]. Досліджувані речовини вводили внутрішньошлунково у дозі 20 мг/кг. Як препарат порівняння використовували анальгін.

Дослідження протимікробної та протигрибової активності проводили у рідкому поживному середовищі [1]. Як поживне середовище використовували розчин амінопептиду (рН=7,2). Мікробне навантаження для бактерій становило $2,5 \times 10^5$ клітин амінопептидної 18-годинної культури в 1 мл середовища. Для вирощування грибів використовували середовище Сабуро (рН=6,5-6,7). Навантаження становило 500 000 репродуктивних тілець в 1 мл.

Гостру токсичність синтезованих речовин вивчали на білих мишах обох статей при внутрішньошлунковому введенні [1].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Аналіз результатів комп'ютерного прогнозу за допомогою програми PASS показав, що вперше синтезовані *b*-N-ацилгідрозиди 4-карбетоксисукцинанілової кислоти (I-VI) з найбільшою вірогідністю повинні проявляти протимікробну, противірусну та протизапальну активність. За класифікацією К.К. Сидорова, *b*-N-ацилгідрозиди 4-карбетоксисукцинанілової кислоти (табл. 2) належать до малотоксичних або нетоксичних речовин, їх DL_{50} при внутрішньошлунковому введенні мишам перебуває в межах 3500-6500 мг/кг. Слід відзначити, що *b*-N-ацилгідрозиди 4-карбетоксиоксанілової кислоти більш токсичні, їх DL_{50} складає 1960-2480 мг/кг [3].

Фармакологічний скринінг на протизапальну активність у дозі 20 мг/кг виявив три сполуки (I-III) на рівні натрію диклофенаку. Протизапальна дія цих речовин збільшувалась пропорційно дозі (табл. 1). Також виявлено, що для ацилгідрозидів 4-карбетоксисукцинанілової кислоти (I-III, VI) характерна помірна анальгетична активність, але за ефектом вони поступаються анальгіну.

Проведені мікробіологічні дослідження показали, що синтезована група сполук (I-VI) активна відносно золотистого стафілокока, сінної, кишкової, синьогнійної паличок та мікроорганізмів роду *Salmonella*. Синтезовані речовини інгібували ріст мікроорганізмів у концентраціях 7,8-500 мкг/мл (табл. 2). Найбільшу бактеріостатичну активність проявляла сполука (VI) відносно золотистого стафілокока, кишкової палички, мікроорганізмів роду *Salmonella* (МПК=7,8-62,5 мкг/мл). Імовірно, це пов'язано з тим, що субстанція (VI) містила в структурі три ковалентнозв'язаних хлора в ацильному фрагменті молекули. Фунгістатична активність ацилгідрозидів 4-карбетоксисукцинанілової кислоти (табл. 2) складала 15,6-500 мкг/мл відносно грибів роду *Candida*. Субстанція (VI) за протигрибовою дією перевищувала нітрофурал відносно *Candida albicans* в 4 рази.

ВИСНОВКИ. 1. З метою пошуку біологічно активних речовин здійснено синтез і встановлено будову *b*-N-ацилгідрозидів 4-карбетоксисукцинанілової кислоти.

2. За програмою PASS проведено комп'ютерний прогноз можливих видів біологічної активності 6 вперше синтезованих субстанцій серед *b*-N-ацилгідрозидів 4-карбетоксисукцинанілової кислоти. За результатами експериментальних фармакологічних досліджень виявлено сполуки з високою протизапальною, помірною анальгетичною, бактеріостатичною та фунгістатичною активністю, а також встановлено деякі закономірності зв'язку "структура-активність-токсичність".

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Таблиця 1 – Фізико-хімічні, ІЧ-спектральні, хроматографічні характеристики та біологічна активність b-N-ацилгідразидів 4-карбетоксисукцинінамілової кислоти

Сполука	R	Вихід, %		M _n	M _w	M _w /M _n	Висхідна температура, °C	Точка плавлення, °C	Точка кипіння, °C	Точка кристалізації, °C	R _f *	Противапальна дія, % у дозі (мг/кг)		Анелігетична дія, % у дозі 20 мг/кг
		А	Б									10	20	
I	3'-C	92	82	1	1	1	14	14	14	14	0,47	20,4	36,2	40,1
II	4'-C	91	80	1	1	1	14	14	14	14	0,49	22,5	34,5	38,7
III	5'-B	85	78	1	1	1	14	14	14	14	0,38	0	12,6	20,4
IV	4'-N ₂	88	83	1	1	1	14	14	14	14	0,45	0	10,2	0
V	2'-N ₂	87	82	1734	1550	1574	1604	1420	805	1322	0,44	0	17,4	0
VI	5'-C	90	77	1732	1654	1578	1600	1412	775	1412	0,40	0	35,1	32,4
Диклофенак (ДБ) / мг													37,5	
Місця НЧОВ / мг													30,0	
Анелігетична дія / мг													-	53

Примітка. * – значення R_f наведено в системі ацетон–гексан (1:1,5).

Таблиця 2 – Бактеріостатична, фунгістатична активність та гостра токсичність b-N-ацилгідразидів 4-карбетоксисукцинінамілової кислоти

Сполука	Бактеріостатична активність	Фунгістатична активність	Гостра токсичність
I	1	2	3
II	4	5	6
III	7	8	9
IV	10	11	12
V	13	14	15
VI	16	17	18
Диклофенак	19	20	21
Місця НЧОВ	22	23	24
Анелігетична дія	25	26	27

Примітка. * – як тест-мікроорганізми використовували:

1. *Staphylococcus aureus*.
2. *Bacillus subtilis*.
3. *Escherichia coli*.
4. *Pseudomonas aeruginosa*.
5. *Salmonella choleraesuis*.
6. *Salmonella dublin*.
7. *Salmonella thyphimurium*.
8. *Salmonella thiphisuis*.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Методичні рекомендації / За ред. О.В. Стефанова. – К.: Авіцена, 2001. – 528 с.
2. Зупанець І.А., Семенов А.М., Ісаєв С.Г. Пошук коректорів запальних захворювань в ряду похідних D-(+)-глюкозаміну // Вісник фармації. – 2010. – № 1 (61). – С. 55-58.
3. Ісаєв С.Г. Синтез, реакційна здатність і біологічна активність похідних орто-галогенбензойних, ароматичних амінокислот та акридину: Автореф. дис. ... д-ра фармац. наук. – Х., 2008. – 36 с.
4. Ісаєв С.Г., Павлій О.І. Розробка дослідно-промислового синтезу етилового ефіру 4-карбетоксиоксанілоїлгідрозиду щавлевої кислоти // Фармац. журн. – 2008. – № 3. – С. 84-87.
5. Ісаєв С.Г., Павлій О.І., Оридорога В.О., Колев В.Ф. Нова технологія синтезу етилового ефіру 4-карбетоксиоксанілоїлгідрозиду щавлевої кислоти – вихідного продукту одержання субстанцій “Монокса”, “Діокса”, “Оксаглюкаміну” та “Оксадиглюкаміну” // VI нац. з'їзд фармацевтів України: Тези доп. – Харків, 2005. – С. 88-90.
6. Пат. № 33249А Україна, МПК С07Н 5/06, А61К 31/70. Диглюкозиламонієва сіль етилового ефіру 4-карбетоксиоксанілоїлгідрозиду щавлевої кислоти, яка проявляє протизапальну, анальгетичну, антиалергічну, антибактеріальну активність / О.І. Павлій, В.М. Коваленко, С.Г. Ісаєв та ін. – Заявл. 27.01.99; Опубл. 15.02.2001. – Бюл. № 1.
7. Пат. № 464112 Україна, МПК С07Н 5/06, А61К 31/70. Лікарський засіб “Оксаглюкамін”, який виявляє протизапальну, ранозагоюючу, антибактеріальну, гастропротекторну та хондропротекторну активність / О.І. Павлій, І.А. Зупанець, С.Г. Ісаєв та ін. – Заявл. 10.07.01; Опубл. 15.05.2002. – Бюл. № 5.
8. Поройков В.В. Компьютерное предсказание биологической активности веществ: пределы возможного // Химия в России. – 1999. – № 2. – С. 8-12.
9. Anzali S., Barnickel G., Cezanne V. et al. Discriminating between drugs and nondrugs by Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS) // J. Med. Chem. – 2001. – № 4 (15). – P. 2432-2437.

С.Г. Ісаєв, З.Г. Ерєміна, А.Н. Семенов, І.А. Зупанец, Л.А. Булыга, А.А. Бризицкий,
Н.П. Кобзарь
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ *b*-N-АЦИЛГИДРАЗИДОВ 4-КАР- БЭТОКСИСУКЦИНАНИЛОВОЙ КИСЛОТЫ

Резюме

Осуществлен синтез *b*-N-ацилгидразидов 4-карбетоксисукцинаниловой кислоты, изучены их физико-химические свойства. Строение синтезированных соединений подтверждено данными элементного анализа и ИК-спектров. Чистоту контролировали методом тонкослойной хроматографии. По программе PASS проведен компьютерный прогноз возможных видов биологической активности 6 впервые синтезированных соединений среди *b*-N-ацилгидразидов 4-карбетоксисукцинаниловой кислоты. Экспериментально установлено, что синтезированные вещества проявляют противовоспалительную, анальгетическую, противомикробную и противогрибковую активность. По классификации К.К. Сидорова, синтезированные вещества при внутривенном введении относятся к классу малотоксичных или нетоксичных соединений ($DL_{50}=2500-6500$ мг/кг).

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: синтез, парааминобензойная и янтарная кислоты, биологическая активность.

S.H. Isayev, Z.H. Yeriomina, A.M. Semenov, I.A. Zupanets, L.O. Bulyha, O.A. Bryztskyi, N.P. Kobzar
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF *b*-N-ACYLHYDRAZIDS ACID 4-CARBETHOXYSUCCINANILIC ACID

Summary

The synthesis of *b*-N-acylhydrazides 4-carbethoxysuccinanic acid and their physical and chemical properties have been studied. The composition of synthesized compounds has been proved by the data of element analysis and their IR-spectra. The purity has been controlled by the method of thin-layer chromatography. The computer prognosis of possible types of biological activity is conducted on the program of 6 the first synthesized connections in the row derivatives of *b*-N-acylhydrazides 4-carbethoxysuccinanic acid. It has been established that the synthesized substances have antiinflammatory, analgetic, antimicrobial and antifungal activity. According to classification by K.K. Sydorov synthesized compounds at intrastomach introduction belong to low and non-toxic compounds ($DL_{50}=2500-6500$ мг/кг).

KEY WORDS: synthesis, para-aminobenzoic and succinanic acids, biological activity.

Отримано 25.10.10

Адреса для листування: С.Г. Ісаєв, вул. Гарібальді 11^а, кв. 21, Харків, 61121, Україна.

Медицина хімія – т. 12, № 4, 2010

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Л.В. Сидоренко, І.В. Українець, О.О. Давиденко¹
 НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ХАРКІВ
 ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
 ІМЕНІ М.І. ПИРОГОВА¹

ВИВЧЕННЯ ПРОСТОРОВОЇ БУДОВИ ГІДРОХЛОРИДУ 3-МОРФОЛІН-4-ІЛПРОПІЛАМІДУ 1-АЛІЛ-4-ГІДРОКСИ-6,7-ДИМЕТОКСІ-2-ОКСО-1,2-ДИГІДРОХІНОЛІН-3-КАРБОНОВОЇ КИСЛОТИ

За допомогою рентгеноструктурного аналізу вивчено особливості просторової будови антагоніста опіоїдних рецепторів нового хімічного класу – гідрохлориду 3-морфолін-4-ілпропіламіду 1-аліл-4-гідрокси-6,7-диметоксі-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбонОВОЇ кислоти.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **аміди, 4-гідрокси-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбонОВОЇ кислоти, антагоністи опіоїдних рецепторів, PCA.**

ВСТУП. Розрахунковий скринінг, проведений нами для найрізноманітніших віртуальних похідних 4-гідроксихінолонів-2 за програмою PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) [8], з наступними біологічними випробовуваннями дозволив виявити серед N-R-амідів 1-аліл-4-гідрокси-6,7-диметоксі-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбонОВОЇ кислоти високоактивні антагоністи опіоїдних рецепторів [2]. Добре відомо, що здатність пов'язуватися з рецепторами, а отже, і біологічний ефект значною мірою визначаються просторовою будовою таких сполук [5, 7, 9]. До цього часу декілька типів опіоїдних рецепторів уже виділені в нативному вигляді, робляться спроби їх клонування [4, 6, 10, 12]. Можливо, найближчим часом тривимірна структура даних біологічних мішеней буде повністю розкрита, що дозволить наблизитися до створення "ідеальних" ліків.

Не менш важливе значення має і просторова будова біологічно активної речовини, яка повинна підходити до рецептора, як ключ до замка. З одного боку, так можна одержати важливу додаткову інформацію про структуру рецептора, а з іншого – визначити в самій речовині її фармакофорні угруповання, тобто певним чином розміщені у просторі функціональні групи молекули, які й забезпечують взаємодію з біологічною мішенню. Враховую-

чи дані обставини, нами проведено рентгеноструктурне дослідження одного з нових антагоністів опіоїдних рецепторів – гідрохлориду 3-морфолін-4-ілпропіламіду 1-аліл-4-гідрокси-6,7-диметоксі-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбонОВОЇ кислоти.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. При вивченні кристалічної будови гідрохлориду 3-морфолін-4-ілпропіламіду 1-аліл-4-гідрокси-6,7-диметоксі-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбонОВОЇ кислоти використано абсолютний метод аналізу – рентгеноструктурне дослідження.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА. Кристали гідрохлориду 3-морфолін-4-ілпропіламіду 1-аліл-4-гідрокси-6,7-диметоксі-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбонОВОЇ кислоти триклинні (безводний етиловий спирт). При 20 °C $a=8.8048(5)$, $b=11.1179(5)$, $c=11.3835(6)$ Å, $\alpha=90.568(4)^\circ$, $\beta=94.072(4)^\circ$, $\gamma=93.415(4)^\circ$, $V=1109.4(1)$ Å³, $M_r=467.94$, $Z=2$, просторова група $P\bar{1}$, $d_{\text{вир.}}=1.401$ г/см³, $\mu(\text{MoK}\alpha)=0.217$ мм⁻¹, $F(000)=496$. Параметри елементарної комірки та інтенсивності 12 836 відображень (6409 незалежних, $R_{\text{int}}=0.016$) виміряно на дифрактометрі Xcalibur-3 (MoK_α випромінювання, CCD-детектор, графітовий монохроматор, ω -сканування, $2\theta_{\text{макс}}=60^\circ$). Структуру розшифровано прямим методом за комплексом програм SHELXTL [11]. Положення атомів водню виявлено з різничного синтезу електронної густоти.

© Л.В. Сидоренко, І.В. Українець, О.О. Давиденко, 2010.

ни й уточнено в ізотропному наближенні. Структуру уточнено за F^2 повноматричним МНК в анізотропному наближенні для неводневих атомів до $wR_2=0.088$ за 6341 відображенням ($R_1=0.035$ за 4361 відображенням з $F>4\sigma$ (F ,

$S=0.914$). Повну кристалографічну інформацію депоновано в Кембриджському банку структурних даних – депонент № CCDC 786068. Міжатомні відстані та валентні кути представлено в таблицях 1 і 2 відповідно.

Таблиця 1 – Довжини зв'язків у структурі досліджуваної сполуки

Зв'язок	<i>l</i> , Å	Зв'язок	<i>l</i> , Å	Зв'язок	<i>l</i> , Å
O(1)–C(9)	1.243(1)	O(2)–C(7)	1.325(1)	O(3)–C(10)	1.261(1)
O(4)–C(15)	1.410(2)	O(4)–C(16)	1.423(2)	O(5)–C(3)	1.357(1)
O(5)–C(21)	1.429(2)	O(6)–C(4)	1.366(1)	O(6)–C(22)	1.415(2)
N(1)–C(9)	1.389(1)	N(1)–C(1)	1.392(1)	N(1)–C(18)	1.473(1)
N(2)–C(10)	1.330(1)	N(2)–C(11)	1.451(2)	N(3)–C(14)	1.499(2)
N(3)–C(17)	1.500(1)	N(3)–C(13)	1.503(1)	C(1)–C(6)	1.401(1)
C(1)–C(2)	1.403(2)	C(2)–C(3)	1.377(2)	C(3)–C(4)	1.424(2)
C(4)–C(5)	1.368(2)	C(5)–C(6)	1.415(2)	C(6)–C(7)	1.429(2)
C(7)–C(8)	1.388(1)	C(8)–C(9)	1.445(1)	C(8)–C(10)	1.473(2)
C(11)–C(12)	1.514(2)	C(12)–C(13)	1.513(2)	C(14)–C(15)	1.510(2)
C(16)–C(17)	1.499(2)	C(18)–C(19)	1.492(2)	C(19)–C(20)	1.315(1)

Таблиця 2 – Валентні кути в структурі досліджуваної сполуки

Валентний кут	ω , град.	Валентний кут	ω , град.	Валентний кут	ω , град.
C(15)–O(4)–C(16)	109.3(1)	C(3)–O(5)–C(21)	117.2(1)	C(4)–O(6)–C(22)	117.4(1)
C(9)–N(1)–C(1)	122.5(1)	C(9)–N(1)–C(18)	117.2(1)	C(1)–N(1)–C(18)	120.3(1)
C(10)–N(2)–C(11)	122.7(1)	C(14)–N(3)–C(17)	110.0(1)	C(14)–N(3)–C(13)	112.3(1)
C(17)–N(3)–C(13)	109.4(1)	N(1)–C(1)–C(6)	120.2(1)	N(1)–C(1)–C(2)	120.7(1)
C(6)–C(1)–C(2)	119.1(1)	C(3)–C(2)–C(1)	120.5(1)	O(5)–C(3)–C(2)	124.0(1)
O(5)–C(3)–C(4)	115.3(1)	C(2)–C(3)–C(4)	120.7(1)	O(6)–C(4)–C(5)	125.9(1)
O(6)–C(4)–C(3)	115.2(1)	C(5)–C(4)–C(3)	118.9(1)	C(4)–C(5)–C(6)	121.0(1)
C(1)–C(6)–C(5)	119.8(1)	C(1)–C(6)–C(7)	118.7(1)	C(5)–C(6)–C(7)	121.4(1)
O(2)–C(7)–C(8)	121.9(1)	O(2)–C(7)–C(6)	117.4(1)	C(8)–C(7)–C(6)	120.6(1)
C(7)–C(8)–C(9)	120.3(1)	C(7)–C(8)–C(10)	118.2(1)	C(9)–C(8)–C(10)	121.5(1)
O(1)–C(9)–N(1)	119.1(1)	O(1)–C(9)–C(8)	123.2(1)	N(1)–C(9)–C(8)	117.6(1)
O(3)–C(10)–N(2)	120.7(1)	O(3)–C(10)–C(8)	119.8(1)	N(2)–C(10)–C(8)	119.4(1)
N(2)–C(11)–C(12)	111.9(1)	C(13)–C(12)–C(11)	114.3(1)	N(3)–C(13)–C(12)	114.8(1)
N(3)–C(14)–C(15)	110.8(1)	O(4)–C(15)–C(14)	112.1(1)	O(4)–C(16)–C(17)	110.9(1)
C(16)–C(17)–N(3)	111.7(1)	N(1)–C(18)–C(19)	113.9(1)	C(20)–C(19)–C(18)	123.3(1)

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. За даними проведеного нами рентгеноструктурного аналізу встановлено, що досліджувана сполука являє собою хлорид органічного катіона (рис. 1, табл. 1 і 2). Позитивний заряд катіона локалізований на протонованому атомі нітрогену морфолінового циклу, який виявлено об'єктивно з рівничного синтезу електронної густини. Про це свідчать також і довжини зв'язків N(3)–C(14) та N(3)–C(17) 1.499(2) та 1.500(1) Å відповідно, значення яких близькі до середньої для зв'язків N–C з позитивно зарядженим нітрогеном

величини 1.485 Å [3]. Органічний катіон пов'язаний з хлорид-аніоном сильним водневим зв'язком N(3)–H(3N)...Cl(1) [H...Cl 2.22 Å, N–H...Cl 170°].

Біциклічний фрагмент, 2-карбонільна, карбамідна, гідроксильна групи, а також атоми C(18), O(5) і O(6) лежать в одній площині з точністю 0.03 Å, чому сприяє утворення міцних внутрішньомолекулярних водневих зв'язків O(2)–H(2O)...O(3) [H...O 1.55 Å, O–H...O 159°] і N(2)–H(2N)...O(1) [H...O 1.96 Å N–H...O 137°]. Утворення міцних O–H...O та N–H...O водневих зв'язків призводить також до помітної поля-

ризації супряженої системи, що проявляється подовженням зв'язків O(1)-C(9) 1.243(1) Å, O(3)-C(10) 1.261(1) Å порівняно з їх середнім значенням 1.210 Å та зв'язку C(7)-C(8) 1.388(1) Å (середнє значення 1.326 Å), а також скоро-

ченням зв'язків O(2)-C(7) 1.325(1) Å (1.362 Å), C(6)-C(7) 1.429(2) Å (1.455 Å) і C(8)-C(9) 1.445(1) Å (1.455 Å), що в цілому характерно для подібних молекулярних систем.

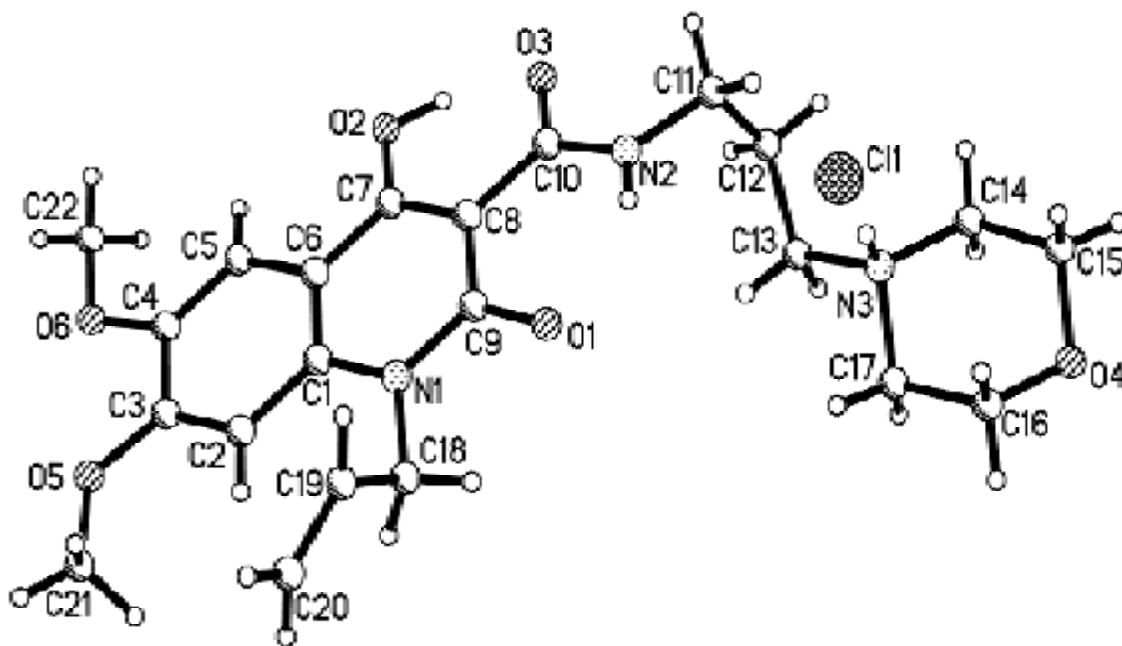


Рис. 1. Будова молекули гідрохлориду 3-морфолін-4-ілпропіламіду 1-аліль-4-гідрокси-6,7-диметоксі-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбонової кислоти з нумерацією атомів.

3-Морфолін-4-ілпропільний замісник перебуває в *sp*-конформації відносно зв'язку C(10)-O(3) [торсійний кут C(11)-N(2)-C(10)-O(3) -7.6(2)°] і зорієнтований практично перпендикулярно до площини карбамідного угруповання [торсійний кут C(10)-N(2)-C(11)-C(12) -83.1(1)°]. Пропановий фрагмент перебуває в *-sc-sc*-конформації [торсійні кути N(2)-C(11)-C(12)-C(13) -57.1(1)°, C(11)-C(12)-C(13)-N(3) -73.8(1)°]. Морфоліновий цикл повернутий таким чином, що зв'язок C(14)-N(3) має *-sc*-орієнтацію відносно зв'язку C(12)-C(13) [торсійний кут C(14)-N(3)-C(13)-C(12) -66.1(1)°]. Така конформація 3-морфолін-4-ілпропільного замісника призводить до виникнення відштовхування між атомами морфолінового циклу та алканового ланцюжка, про що свідчать скорочені внутрішньомолекулярні контакти H(12a)...C(14) 2.75 Å (сума ван-дерваальсових радіусів [1] складає 2.87 Å), H(12a)...H(14a) 2.29 Å (2.34 Å) і H(13b)...H(17b) 2.33 Å (2.34 Å). Насичений морфоліновий цикл перебуває у конформації *крісло* (параметри складчастості [13] S=1.16, $\Theta=4.8^\circ$, $\Psi=3.2^\circ$). Відхилення атомів N(3) і O(4) від середньоквадратичної площини

інших атомів морфолінового кільця складають -0.61 Å та 0.68 Å відповідно.

Сильне відштовхування між атомами алільного замісника та хінолонового кільця [скорочені внутрішньомолекулярні контакти H(2)...C(18) 2.49 Å (сума ван-дерваальсових радіусів 2.87 Å), H(2)...H(18b) 2.15 Å (2.34 Å), H(2)...C(19) 2.63 Å (2.87 Å), H(2)...C(20) 2.84 Å (2.87 Å), H(18a)...O(1) 2.19 Å (2.46 Å) та H(18b)...C(2) 2.64 Å (2.87 Å)] призводить до подовження зв'язків N(1)-C(9) до 1.389(1) Å і N(1)-C(1) до 1.392(1) Å порівняно з їх середніми значеннями 1.353 та 1.371 Å відповідно. Винільний фрагмент алільного замісника при атомі нітрогену в положенні 1 хінолонового ядра перебуває в *ac*-конформації відносно зв'язку N(1)-C(9), а сам алільний замісник має конформацію, близьку до антиклинальної [торсійні кути C(9)-N(1)-C(18)-C(19) 107.0(1)° та N(1)-C(18)-C(19)-C(20) 137.8(1)° відповідно].

Віцинальні метоксизамісники практично копланарні до площини хінолонового циклу [торсійні кути C(21)-O(5)-C(3)-C(2) 4.4(2)°, C(22)-O(6)-C(4)-C(5) 1.2(2)°], незважаючи на досить сильне відштовхування між атомами

метильних груп та ароматичного ядра. Про це свідчать скорочені внутрішньомолекулярні контакти Н(2)...С(21) 2.49 Å (2.87 Å), Н(2)...Н(21b) 2.33 Å (2.34 Å), Н(21b)...С(2) 2.79 Å (2.87 Å), Н(21с)...С(2) 2.78 Å (2.87 Å), Н(5)...С(22) 2.53 Å (2.87 Å), Н(22а)...С(5) 2.84 Å (2.87 Å) та Н(22с)...С(5) 2.76 Å (2.87 Å). Очевидно, стерична напруга частково компенсується збільшенням валентних кутів О(5)-С(3)-С(2) та О(6)-С(4)-С(5) до 124.0(1)° і 125.9(1)° відповідно.

У кристалі гідрохлориду 3-морфолін-4-ілпропіламіду 1-аліл-4-гідрокси-6,7-диметоксі-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбонової кислоти виявлено також серію С-Н...Сl' міжмолекулярних водневих зв'язків: С(11)-Н(11b)...Сl(1)' [Н...Сl 2.69 Å, С-Н...Сl 148°]; С(12)-Н(12а)...Сl(1)' (-x, 1-y, 2-z) [Н...Сl 2.94 Å, С-Н...Сl 136°]; С(14)-

Н(14а)...Сl(1)' (-x, 1-y, 2-z) [Н...Сl 2.77 Å, С-Н...Сl 166°]; С(16)-Н(16а)...Сl(1)' (1-x, 1-y, 2-z) [Н...Сl 2.98 Å, С-Н...Сl 119°]; С(17)-Н(17b)...Сl(1)' (1-x, 1-y, 2-z) [Н...Сl 2.88 Å, С-Н...Сl 123°]] та С-Н...π міжмолекулярний водневий зв'язок С(17)-Н(17а)...С(3)' (x, y, 1+z) [Н...π 2.76 Å, С-Н...π 164°].

ВИСНОВОК. Проведено рентгеноструктурне дослідження гідрохлориду 3-морфолін-4-ілпропіламіду 1-аліл-4-гідрокси-6,7-диметоксі-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбонової кислоти, який за своїми біологічними властивостями є антагоністом опіоїдних рецепторів. Показано, що просторова будова цієї речовини значною мірою визначається специфічними системами внутрішньомолекулярних та міжмолекулярних водневих зв'язків.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Зефіров Ю.В. Сокращенные межмолекулярные контакты и специфические взаимодействия в молекулярных кристаллах // Кристаллография. – 1997. – **42**, № 5. – С. 936-958.
2. Пат. 85989 Україна, МПК С07D 215/20, А61Р 25/30. Гідрохлориди алкіл-аміноалкіламідів 1-аліл-4-гідрокси-6,7-диметоксі-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбонової кислоти, які виявляють властивості антагоністів опіоїдних рецепторів / І.В. Українець, Л.В. Сидоренко, О.О. Давиденко та ін. – Опубл. 10.03.2009. – Бюл. № 5. – 5 с.
3. Burgi H.-B., Dunitz J.D. Structure correlation. – Weinheim: VCH, 1994. – 2. – 926 p.
4. Carliss R.D., Keefer J.F., Perschke S. et al. Receptor reserve reflects differential intrinsic efficacy associated with opioid diastereomers // Pharmacol. Biochem. Behav. – 2009. – **92**, № 3. – P. 495-502.
5. Cueva J.P., Cai T.B., Mascarella S.W. et al. Synthesis and in vitro opioid receptor functional antagonism of methyl-substituted analogues of (3R)-7-hydroxy-N-[(1S)-1-[(3R,4R)-4-(3-hydroxyphenyl)-3,4-dimethyl-1-piperidinyl]methyl]-2-methylpropyl]-1,2,3,4-tetrahydro-3-isoquinolinecarboxamide (JDTic) // J. Med. Chem. – 2009. – **52**, № 23. – P. 7463-7472.
6. Gorin F.A., Marshall G.R. Proposal for the biologically active conformation of opiates and enkephalin // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 1977. – **74**, № 11. – P. 5179-5183.

7. Hsin L.W., Chang L.T., Rothman R.B. et al. Synthesis and opioid activity of enantiomeric N-substituted 2,3,4,4a,5,6,7,7a-octahydro-1H-benzofuro[3,2-e]isoquinolines // J. Med. Chem. – 2010. – **53**, № 3. P. 1392-1396.
8. <http://www.ibmc.msk.ru/PASS/> чи <http://ibmc.p450.ru/PASS/>
9. Kracht D., Rack E., Schepmann D. et al. Stereoselective synthesis and structure-affinity relationships of bicyclic kappa receptor agonists // Org. Biomol. Chem. – 2010. – **8**, № 1. – P. 212-225.
10. Law P.Y., Wong Y.H., Loh H.H. Mutational analysis of the structure and function of opioid receptors // Biopolymers. – 1999. – **51**, № 6. – P. 440-455.
11. Sheldrick G.M. // SHELXTL PLUS. PC Version. A system of computer programs for the determination of crystal structure from X-ray diffraction data. – University of Göttingen. – Germany. – Rev. 5.1. – 1998.
12. Wang J.B., Imai Y., Eppler C.M. et al. Mu opiate receptor: cDNA cloning and expression // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 1993. – **90**, № 21. – P. 10230-10234.
13. Zefirov N.S., Palyulin V.A., Dashevskaya E.E. Stereochemical studies. XXXIV. Quantitative description of ring puckering via torsional angles. The case of six-membered rings // J. Phys. Org. Chem. – 1990. – **3**, № 3. – P. 147-154.

Л.В. Сидоренко, И.В. Українець, А.А. Давиденко¹
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ
ВИННИЦКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ Н.И. ПИРОГОВА¹

ИЗУЧЕНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОГО СТРОЕНИЯ ГИДРОХЛОРИДА 3-МОРФОЛИН-4-ИЛПРОПИЛАМИДА 1-АЛЛИЛ-4-ГИДРОКСИ-6,7-ДИМЕТОКСИ- 2-ОКСО-1,2-ДИГИДРОХИНОЛИН-3-КАРБОНОВОЙ КИСЛОТЫ

Резюме

С помощью рентгеноструктурного анализа изучены особенности пространственного строения антагониста опиоидных рецепторов нового химического класса – гидрохлорида 3-морфолин-4-илпропиламида 1-аллил-4-гидрокси-6,7-диметокси-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-3-карбоновой кислоты.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: амиды, 4-гидрокси-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-3-карбоновые кислоты, антагонисты опиоидных рецепторов, PСA.

L.V. Sydorenko, I.V. Ukrayinets, A.A. Davydenko¹
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV
M.I. PYROHOV VINNYTSIA NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY¹

THE STUDY OF THE SPATIAL STRUCTURE OF 1-ALLYL-4-HYDROXY-6,7- DIMETHOXY-2-OXO-1,2-DIHYDROQUINOLINE-3-CARBOXYLIC ACID 3- MORPHOLIN-4-YLPROPYLAMIDE HYDROCHLORIDE

Summary

The peculiarities of the spatial structure of opioid receptors antagonist of a new chemical class – 1-allyl-4-hydroxy-6,7-dimethoxy-2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carboxylic acid 3-morpholin-4-ylpropylamide hydrochloride by the means of X-ray structural analysis have been studied.

KEY WORDS: amides, 4-hydroxy-2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carboxylic acids, pyrimidines, opioid receptors antagonists, X-ray structural analysis.

Отримано 22.04.10

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

**ДОСЛІДЖЕННЯ ЛІПОФІЛЬНИХ ФРАКЦІЙ ЛИСТЯ ДЕЯКИХ
ДЕКОРАТИВНИХ РОСЛИН**

Уперше проведено аналіз якісного складу і кількісного вмісту ряду БАР ліпофільної фракції листя жимолості татарської, сніжногідника білого, сніжногідника західного та ясена звичайного. Встановлено наявність сполук порфіринової природи, а також визначено кількісний вміст суми каротиноїдів та суми хлорофілів. Досліджено жирнокислотний склад ліпофільної фракції.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: якісний та кількісний вміст БАР, листя жимолості татарської, сніжногідника білого, сніжногідника західного, ясена звичайного.

ВСТУП. Декоративні рослини є перспективними джерелами отримання лікарської сировини [4]. Олистяні пагони видаляють при формуванні крони дерев та кущів, вони є відходами зеленого будівництва, при цьому не завдається шкода рослинам. У нашій країні поширені як декоративні деревинні рослини представники родини жимолостевих Caprifoliaceae (жимолость татарська *Lonicera tatarica* L., сніжногідник білий *Symphoricarpus alba* L. та сніжногідник західний *Symphoricarpus occidentalis* Hook) і родини маслинних Oleaceae (ясен звичайний *Fraxinus excelsior* L.) [3, 6, 7].

Метою даної роботи було одержання і дослідження ліпофільних фракцій (ЛФ) листя жимолості татарської, сніжногідника білого, сніжногідника західного та ясена звичайного.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Листя жимолості татарської, сніжногідника білого, сніжногідника західного та ясена звичайного заготовляли у фазу повного розгортання листової пластинки (травень 2008 року) на території Ботанічного саду Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Після повітряно-тіньового сушіння сировину подрібнювали на подрібнювачі ЛЗМ-1, фракцію, що пройшла крізь сито № 2000, вичерпно екстрагували в апараті Сокслета хлороформом. Відфільтрований та висушений зневодненням натрію сульфатом хлороформний витяг упарювали у вакуумі до видалення органічного розчинника. Таким чином отримано ЛФ листя рослин, які вивчали. Для дослідження якісного складу ЛФ отримували тримірні спектри

© В.В. Малий, 2010.

флуоресценції методом тримірної скануючої спектрофлуориметрії в ультрафіолетовому та видимому діапазонах спектра за допомогою спектрофлуориметра Hitachi F4010 [1].

Відносну густину, показник заломлення, кислотне, ефірне, йодне числа та число омилення ЛФ встановлювали за методиками ДФУ І видання [2]. Показник заломлення визначали на рефрактометрі РЛ-1. Визначення кількісного вмісту суми хлорофілів та суми каротиноїдів у ЛФ проводили спектрофотометричним методом шляхом деконволюції спектрів поглинання на складові смуги (програми комплексу SpectraDataLab, розробка А.О. Дорошенко, НДІ хімії при ХНУ імені В.Н. Каразіна) в перерахунку на хлорофіл а та β-каротин відповідно [1]. Для вивчення якісного складу та кількісного вмісту жирних кислот у ЛФ отримували їх метилові ефіри й аналізували методом газорідинної хроматографії на хроматографі Хром-5 [5], металева колонка завдовжки 2,6 м, сорбент "Хроматин-супер", із 10 % полідіетиленглікольсукцинату. Аналіз проб жирних кислот здійснювали в ізотермічному режимі при 195 °С та нагріванні полум'яно-іонізаційного детектора – 250 °С. Швидкість газу-носія азоту високої чистоти – 50 мл/хв, водню – 30 мл/хв, повітря – 300 мл/хв.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Вихід ЛФ листя жимолості татарської становив 3,8 %, сніжногідника білого – 3,2 %, сніжногідника західного – 2,9 %, ясена звичайного – 4,5 % в розрахунку на абсолютно суху сировину. Аналіз тримірних спектрів флуоресценції ЛФ та їх проекції на площину збудження/емісія показав у спектрах всіх ЛФ, які вивчали, наявність групи піків, характерних для флуорес-

ценції суміші хлорофілів а та b. Ці піки спостерігалися в ділянці λ_{exc} – 280-450, 480-530, 600-700 нм, λ_{em} – 650-760 нм. Крім того, в спектрі ЛФ сніжнягідника західного в ділянці λ_{exc} – 460-490 нм, λ_{em} – 640-670 нм спостерігався пік, властивий іншим похідним порфіринової природи. Результати визначення відносної густини, показника заломлення, кислотного, ефірного, йодного чисел та числа омилення ЛФ рослин, які вивчали, відрізнялися незначно. Дані щодо кількісного вмісту суми хлорофілів та суми каротиноїдів наведено в таблиці 1. Найвищий вміст суми каротиноїдів становив $(283,51 \pm 0,58)$ мг% і був притаманний ЛФ листя сніжнягідника західного. Цей показник в 1,8 раза вищий вмісту даної групи сполук у ЛФ

листя жимолості татарської $((158,29 \pm 0,15)$ мг%) та в 1,4 раза вищий, ніж у ЛФ листя сніжнягідника білого $((199,29 \pm 0,29)$ мг%). Для ЛФ сніжнягідника західного також характерний високий вміст суми хлорофілів $((510,56 \pm 0,50)$ мг%).

Жирнокислотний склад ЛФ листя рослин, які вивчали (табл. 2), в якісному відношенні індивідуальний для кожного об'єкта. Лише в ЛФ листя жимолості татарської знайдено ейкозатриєнову кислоту, а в ЛФ листя сніжнягідника білого – пальмітолеїнову. Вміст суми ненасичених жирних кислот домінував у ЛФ листя жимолості татарської та ясена звичайного, а насичених – у ЛФ листя обох видів сніжнягідників. Домінуючими компонентами були: в ЛФ листя жимолості татарської – ейкозатриє-

Таблиця 1 – Деякі показники ЛФ листя жимолості татарської, сніжнягідника білого, сніжнягідника західного та ясена звичайного

ЛФ листя рослин, які вивчали	Кількісний вміст у ЛФ (в мг/100 г, у розрахунку на абсолютно суху речовину)	
	суми каротиноїдів (у розрахунку на β -каротин)	суми хлорофілів (у розрахунку на хлорофіл а)
Жимолості татарської	158,25±0,17	273,30±0,26
Сніжнягідника білого	199,29±0,15	328,40±0,48
Сніжнягідника західного	283,51±0,58	510,56±0,50
Ясена звичайного	270±0,02	240±0,01

Таблиця 2 – Жирнокислотний склад ЛФ листя жимолості татарської, сніжнягідника білого, сніжнягідника західного та ясена звичайного (в %, у розрахунку на абсолютно сухий залишок ЛФ)

Індекс	Назва жирної кислоти	Вміст жирної кислоти в ЛФ листя			
		жимолості татарської	сніжнягідника білого	сніжнягідника західного	ясена звичайного
C12:0	лауринова	0,08	0,04	0,23	-
C14:0	міристинова	0,20	0,20	0,17	-
C15:0	пентадеканова	-	-	-	0,22
C16:0	пальмітинова	1,00	1,45	1,25	2,63
C16:1	пальмітолеїнова	-	0,10	-	-
C18:0	стеаринова	0,20	0,35	0,18	0,59
C18:1n9	олеїнова	0,50	0,90	1,00	3,23
C18:2n9,12	лінолева	1,00	1,10	1,00	2,34
C18:3n9,12,15	α -ліноленова	сліди	0,30	0,35	0,34
C20:0	арахінова	1,70	5,80	5,40	-
C20:3	ейкозатриєнова	4,40	-	-	-
C20:4	арахідонова	1,00	-	0,30	2,30
C20:1n11	гондолієва	-	-	-	0,37
C22:0	бегенова	-	-	-	0,14
Вміст суми насичених жирних кислот		3,18	7,84	7,23	3,58
Вміст суми ненасичених жирних кислот		6,90	2,40	2,65	8,58
Загальний вміст суми жирних кислот		10,08	10,24	9,88	12,16

нова кислота (4,40 %), в ЛФ листя сніжнягідника білого та сніжнягідника західного – арахінова (5,80 та 5,40 % відповідно), в ЛФ листя ясена звичайного – олеїнова (3,23 %).

ВИСНОВКИ. 1. Отримано та досліджено ЛФ листя жимолості татарської, сніжнягідника білого, сніжнягідника західного та ясена звичайного. За допомогою тримірної спектрофлуориметрії доведено наявність хлорофілів а та b.

2. Визначено числові показники ЛФ (відносна густина, показник заломлення, кислотне, ефірне, йодне числа та число омилен-

ня) та кількісний вміст суми хлорофілів і суми каротиноїдів. Найвищий вміст сполук цих груп характерний для ЛФ листя сніжнягідника західного ((283,51±0,58) та (510,56±0,50) мг% відповідно).

3. Вперше було досліджено якісний склад та кількісний вміст жирних кислот у ЛФ листя жимолості татарської, сніжнягідника білого, сніжнягідника західного та ясена звичайного. Вміст суми ненасичених жирних кислот домінував у ЛФ жимолості татарської та ясена звичайного, а насичених – у ЛФ листя обох видів сніжнягідників.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Визначення видового походження рослинних олій /В.А. Параніч, А.О. Дорошенко, О.Д. Рошаль [та ін.] // Фармац. журн. – 2000. – № 5. – С. 86-90.
2. Державна Фармакопея України. – Державне підприємство “Науково-експертний фармакопейний центр”. – 1-ше вид. – Х. : РІРЕГ, 2001. – 556 с.
3. Дикорастущие полезные растения России / Отв. ред. А.А. Буданцев, Е.Е. Лесиовская. – СПб. : Изд-во СПХФА, 2001. – 663 с.
4. Ємельянова І.В. Динаміка накопичення суми ліпофільних сполук в екстрактах грінделії розчепі-

реної / І.В. Ємельянова, В.М. Ковальов, І.О. Журавель // Фармаком. – 2003. – № 1. – С. 57-64.

5. К вопросу о методах стандартизации рыбьего жира. Определение жирнокислотного состава и количественного содержания витамина D₃ в рыбьем жире / Э.Э. Котова, А.А. Зинченко, А.Ю. Куликов [и др.] // Фармаком. – 2002. – № 2. – С. 83-91.

6. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейства Rutaceae - Elaeagnaceae. – Л. : Наука, 1998. – 357 с.

7. Флора СССР : в 30 т. / под ред. В.Л. Комарова. – Л. : Изд-во АН СССР, 1953. – Т. 18. – С. 483.

В.В. Малий

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИПОФИЛЬНЫХ ФРАКЦИЙ ЛИСТЬЕВ НЕКОТОРЫХ ДЕКОРАТИВНЫХ РАСТЕНИЙ

Резюме

Впервые проведен анализ качественного состава и количественного содержания ряда БАВ липофильной фракции листьев жимолости татарской, снежнягодника белого, снежнягодника западного и ясеня обыкновенного. Установлено наличие соединений порфиринового происхождения, а также определено количественное содержание суммы каротиноидов и суммы хлорофиллов. Исследован жирнокислотный состав липофильной фракции.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: качественное и количественное содержание БАВ, листья жимолости татарской, снежнягодника белого, снежнягодника западного, ясеня обыкновенного.

V.V. Maliy

NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

RESEARCH OF LIPOPHYLE FRACTIONS OF LEAVES OF SOME DECORATIVE PLANTS

Summary

The comparative analysis of qualitative composition and quantitative contents of BAS, and also number indexes of the lipophyle fractions from the leaves *Lonicera tatarica* L., *Symphoricarpus alba* L., *Symphoricarpus occidentalis* Hook., *Fraxinus excelsior* L. are first implemented. The presence of compounds of porphyrin nature is identified in composition of the fractions. (relative density, refraction index, soap number, ether number, iodine number) contents of carotenoids and chlorophylls are also defined. Lipophile fractions, their composition of fat acids are studied.

KEY WORDS: qualitative composition and quantitative contents of BAS, leaves *Lonicera tatarica* L., *Symphoricarpus alba* L., *Symphoricarpus occidentalis* Hook., *Fraxinus excelsior* L.

Отримано 06.04.10

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

ВПЛИВ ВІТАМІННО-МІКРОЕЛЕМЕНТНОГО КОМПЛЕКСУ ТА БЕТАЇНУ НА СТАН СИСТЕМИ ГЕМОСТАЗУ В ЩУРІВ З ГІПОВІТАМІНОЗНО-МЕТІОНІНОВОЮ ГІПЕРГОМОЦИСТЕЇНЕМІЄЮ

Досліджено вплив вітамінно-мікроелементного комплексу (ВМК) та бетаїну на стан системи гемостазу, рівень сірковмісних амінокислот у плазмі крові й інші біохімічні показники в щурів з гіповітамінозно-метіоніновою гіпергомоцистеїнемією (ГГЦ). Показано, що введення ВМК (71,5 мг/кг інтрагастрально) протягом 7 діб нормалізує вміст гомоцистеїну та цистеїну в плазмі крові, викликає регрес ГГЦ-індукованих метаболічних порушень, відновлює рівновагу в системі гемостазу. Бетаїн (450 мг/кг інтрагастрально) знижує ступінь ГГЦ, активує процеси метилування, зменшує прояви гіперреактивності тромбоцитів. За гіпогомоцистеїнемічним та антитромбогенним ефектами бетаїн поступається ВМК.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: гіпергомоцистеїнемія, гемостаз, тромбофілія, вітамінно-мікроелементний комплекс, бетаїн.

ВСТУП. Гіпергомоцистеїнемію (ГГЦ) розглядають як незалежний фактор ризику кардіоваскулярної патології та тромбозів. Основними причинами ГГЦ вважають аліментарний дефіцит вітамінів групи В, уроджені дефекти ензимів обміну цих вітамінів та надлишок метіоніну, який блокує цикл метилування і зумовлює накопичення ГЦ [9]. Саме тому з метою корекції ГГЦ застосовують вітаміни В₆, В₉, В₁₂, які входять до складу ключових ензимів утилізації ГЦ (метилентетрагідрофолатредуктази, метіонінсинтетази, цистатіонін-β-синтази, цистатіонін-γ-ліази) [9]. Вказані вітаміни здебільшого призначають у високих дозах, кожний окремо або в різних комбінаціях, у тому числі й за умов їх поєднання з мікроелементами (цинком, хромом, ванадієм та ін.) – есенціальними чинниками багатьох метаболічних процесів. Серед невітамінних засобів з гіпогомоцистеїнемічною дією найбільш перспективним вважають бетаїн, який є донором метильних груп при регенерації ГЦ до метіоніну з участю бетаїногемосцистеїнметилтрансферази [20].

Незважаючи на доведену здатність вітамінно-мікроелементних комплексів та бетаїну зменшувати вміст ГЦ у плазмі крові, їх вплив на інші патогенетичні ланки ГГЦ достеменно не з'ясовано. Раніше ми показали, що збага-

чення раціону тварин вітамінно-мікроелементним комплексом (ВМК) пом'якшує депримуючий вплив тривалого навантаження тіолактоном ГЦ на обмін цистеїну та аденозину, зменшує прояви оксидативного стресу, гіпометилування, дефіциту вазодилаторів та антиагрегантів – гідроген сульфід (H₂S), оксиду азоту (NO) і, відповідно, стримує формування ГГЦ-індукованої тромбофілії [6]. Метою цієї роботи була оцінка спроможності ВМК і бетаїну коригувати ГГЦ-індуковані метаболічні та гемостазіологічні розлади за умов комбінованої гіповітамінозно-метіонінової ГГЦ у щурів.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди проведені на 60 білих нелінійних щурах-самцях масою 200-260 г. Під час експериментів тварин утримували в стандартних умовах, з 12-годинним режимом “день/ніч” і вільним доступом до води та їжі. За 10 діб до початку експерименту всі тварини були переведені на основну дієту (ОД) – стандартну напівсинтетичну (крохмально-казеїнову) дієту, яка забезпечувала надходження в організм щурів оптимальної кількості всіх макро- і мікронутрієнтів [5]. Після адаптації до ОД тварин поділили на 6 груп – по 10 щурів у кожній. Тварини 3-6 груп (групи з ГГЦ) протягом двох тижнів отримували “гіповітамінозно-метіонінову” дієту, яка відрізняється від ОД відсутністю вітамінів В₆, В₉, В₁₂ та на-

© Н.В. Заїчко, М.А. Артемчук, 2010.

явністю 1 % метіоніну (за рахунок еквівалентного зменшення частки казеїну). Споживання такої дієти індукує збільшення вмісту ГЦ в плазмі крові щурів у 10-13 разів на 15 добу досліду [2, 5]. Контролем (1-ша група) слугували інтактні тварини, які перебували на ОД. Додатковий контроль (2-гу групу) – “контроль на гіповітаміноз” становили тварини, які отримували дієту, що відрізняється від ОД відсутністю вітамінів B_6 , B_9 , B_{12} . До дефіцитних щодо вітамінів групи В дієт додавали 1 % фталазолу (Дарниця, Україна) для пригнічення синтезу вітамінів кишковою мікрофлорою. Фталазол не всмоктується, не виявляє системної дії та біохімічних порушень, не впливає на рівень ГЦ у плазмі крові [2, 5].

Тварин 1-ї, 2-ї і 3-ї (ГГЦ) груп виводили з експерименту на 15 добу шляхом дислокації шийних хребців після забору крові. Решту тварин з моделлю ГГЦ (4-та, 5-та, 6-та групи) з 16 доби перевели на ОД, на тлі якої двом групам щурів вводили ВМК (суміш вітамінів B_9 , B_6 , B_{12} , координаційних сполук цинку та хрому з N-2,3-диметилфенілантраніловою кислотою і амонію ванадату) або бетаїн. ВМК застосовували в дозі 71,5 мг/кг, що забезпечувала надходження 714 мкг вітаміну B_6 , 143 мкг вітаміну B_9 , 14,3 мкг вітаміну B_{12} , 1 мг іонів цинку (Zn^{2+}), 7,5 мкг іонів хрому (Cr^{3+}) та 0,93 мкг іонів ванадію (V^{5+}) на 1 кг маси тіла тварин (5-та група), бетаїн – в дозі 450 мг/кг маси тіла (6-та група). Засоби вводили інтрагастрально на 1 % розчині крохмалю 1 раз на добу протягом 7 діб. З досліду тварин 4-ї, 5-ї, 6-ї груп виводили на 23 добу. Досліди виконували згідно з міжнародними вимогами (Страсбург, 1986) та правилами гуманного ставлення до експериментальних тварин, затвердженими комітетом з біоетики Вінницького національного університету імені М.І. Пирогова.

Кров набирали із серця після анестезування тварин кетаміном (100 мг/кг внутрішньочеревино) в пластикові пробірки Vacuette (Greiner Bio-One, Австрія): для гематологічних і біохімічних досліджень – з K_2EDTA та без антикоагулянтів, для дослідження показників гемостазу – з 3,8 % розчином цитрату натрію у співвідношенні 9:1. Багату та бідну на тромбоцити плазму крові отримували звичайними методами.

Активованій частковий тромбопластиновий час (АЧТЧ), протромбіновий час (ПЧ), тромбіновий час (ТЧ), активність протеїну С, антитромбіну III та вміст інгібітора активатора плазміногену-1 (PAI-1) визначали за наборами

“Техпластин-тест”, “АПТВ-ЕІ-тест”, “Тромботест”, “Хромотех-Антитромбин” (Технологія-Стандарт, Росія), “Реахром-Протеїн С” (РЕНАМ, Росія), “Zymutest Rat - PAI-1 (Antigen)” (Франція). Вміст фібриногену визначали спектрофотометричним методом [1]. Вміст розчинних фібрин-мономерних комплексів (РФМК) визначали у паракоагуляційному тесті з використанням фосфатних буферів. Агрегацію тромбоцитів досліджували у зразках багаті на тромбоцити плазми крові на агрегометрі AP2110 Солар, як індуктор агрегації використовували АДФ у кінцевій концентрації 5 мкМ. Кількість та середній об’єм тромбоцитів (MPV, фл) визначали на гематологічному аналізаторі Erma PCE-210 (Японія).

Рівень загального ГЦ визначали імуноферментним методом за набором “Homocysteine EIA” (Axis-Shield, Англія). Вміст H_2S в плазмі крові визначали, як описано [3]. Вміст SH-груп протеїнів визначали за реакцією з реактивом Елмана. Вміст загального цистеїну в плазмі крові визначали за реакцією з нінгідрином після інкубації плазми з дитіотреїтолом [18]. Вміст непротеїнової (НП) фракції цистеїну визначали після осадження протеїнів плазми крові ацетонітрилом та інкубації супернатанту з дитіотреїтолом. Кількість протеїнів’язаного (ПЗ) цистеїну розраховували як різницю між загальним та непротеїновим цистеїном. Суму нітритів та нітратів у плазмі крові визначали за реакцією Грісса [8]. Вміст малонового діальдегіду (МДА) визначали за реакцією з тіобарбітуровою кислотою [4], карбонільних груп протеїнів (КГП) – за реакцією з 2,4-динітрофенілгідразиним [7]. Фосфоліпідні фракції плазми крові – фосфатидилхолін (ФХ), лізофосфатидилхолін (ЛФХ), фосфатидилетаноламін (ФЕА) визначали методом тонкошарової хроматографії на силікагелі Л5/40, кількісну оцінку проводили після хроматографії за реакцією з фосфорнованіліновим реактивом. Активність 5'-нуклеотидази (КФ 3.1.3.5) та апірази (КФ 3.6.1.5) визначали за кількістю неорганічного фосфату, який утворився при гідролізі АМФ чи АДФ [10, 15]. Активність аденозиндезамінази (КФ 3.5.4.4) оцінювали за кількістю аміаку, що утворився при гідролітичному дезамінуванні аденозину [11].

Обробку результатів проводили за допомогою стандартних статистичних програм “MS Excel XP”. Вірогідність відмінностей оцінювали за t-критерієм Стьюдента. Достовірною вважали різницю при $p < 0,05$. Результати представлено як $M \pm m$.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Як свідчать результати наших досліджень (табл. 1), перевантаження раціону тварин метіоніном на тлі дефіциту вітамінів B₆, B₉, B₁₂ викликало розвиток тяжкої ГГЦ. Так, станом на 15 добу в щурів 3-ї групи реєстрували зростання вмісту ГЦ у плазмі крові (в 13,2 раза), виявляли помірну гіперцистеїнемію (вміст загального і непротеїнового цистеїну в плазмі крові збільшувався в 1,2 та 1,8 раза), зменшувався вміст H₂S (в 1,6 раза) і стабільних метаболітів оксиду азоту (в 1,4 раза), накопичувались продукти пероксидації протеїнів та ліпідів, знижувався вміст SH-груп протеїнів, порушувались процеси метилювання – зменшувались вміст ФХ та відношення ФХ/ФЕА (в 1,4 і 2,4 раза відповідно), спостерігались розлади нуклеотидного обміну

– зменшувалась (в 1,4 раза) активність апірази та 5'-нуклеотидази, підвищувалась (в 1,6 раза) активність аденозіндезамінази. За умов фізіологічного вмісту метіоніну в раціоні тварин (2-га група) двотижневий дефіцит вітамінів B₆, B₉, B₁₂ не викликав значних біохімічних порушень, хоча стійку тенденцію (p<0,1) до зростання рівня ГЦ у плазмі крові було зафіксовано. Однак більш тривалий дефіцит хоча б одного із вказаних вітамінів (4-8 тижнів та більше) призводив до розвитку значної ГГЦ [12, 17].

Нормалізація дієти тварин (4-та група) протягом 7 діб сприяла елімінації надлишку сірковмісних амінокислот з плазми крові й достовірно зменшувала ступінь ГГЦ (в 3,6 раза відносно інтактного контролю) та гіперцистеїнемії, однак помітного регресу інших метабо-

Таблиця 1 – Вплив ВМК та бетаїну на біохімічні показники в плазмі крові щурів із ГГЦ (n=10, M±m)

Показник	Стан на 15 добу			Стан на 23 добу		
	1-ша група	2-га група	3-тя група	4-та група	5-та група	6-та група
	контроль інтактний	контроль гіпо-вітаміноз	ГГЦ	ГГЦ+ОД	ГГЦ+ОД+ВМК	ГГЦ+ОД+бетаїн
Загальний ГЦ, мкМ	6,23±0,62	7,78±0,52	82,1±4,73*	22,4±1,70*ψ	5,81±0,49#	16,8±1,41*#§
Загальний цистеїн, мкМ	128±6,41	123±5,29	157±9,40*	143±4,21	122±5,44#	139±5,52§
НП цистеїн, мкМ	42,9±2,79	40,1±1,82	75,6±3,62*	62,2±2,10* ψ	40,6±1,94#	52,0±3,31*#§
ПЗ цистеїн, мкМ	85,2±5,96	83,0±4,60	81,0±9,89	80,7±4,97	81,5±3,91	86,7±7,93
H ₂ S, мкМ	79,0±6,76	65,9±2,98	33,4±5,73*	47,0±5,07*	84,4±4,98#	56,8±7,65*§
ГЦ/H ₂ S	0,09±0,02	0,12±0,01	3,55±0,87*	0,56±0,10* ψ	0,07±0,01#	0,37±0,06*§
Нітрати та нітрити, мкМ	57,7±3,40	52,4±1,40	34,9±2,85*	38,9±3,68*	58,4±3,55#	45,6±3,68*§
SH-групи протеїнів, мМ	8,84±0,38	7,95±0,36	5,59±0,43*	6,56±0,37*	8,78±0,35#	7,08±0,51*§
КГП, нмоль/мг протеїну	0,73±0,04	0,78±0,08	1,46±0,13*	1,09±0,08*	0,76±0,06#	1,01±0,04*§
МДА, мкМ	10,2±0,76	10,4±0,36	14,9±1,21*	13,0±0,95*	9,89±0,52#	12,3±0,53*§
ФХ, мг/л	1591±71,6	1584±98,4	1121±42,4*	1332±69,9* ψ	1510±48,0#	1472±47,9
ЛФХ, мг/л	56,3±2,17	63,1±3,73	86,1±6,61*	71,6±4,63*	57,3±4,53#	68,1±4,02*
ФЕА, мг/л	695±21,0	717±30,6	1192±66,6*	1096±46,6*	769±33,5#	777±39,5#
ФХ/ЛФХ	28,8±1,99	26,4±2,81	14,0±1,63*	19,0±1,19* ψ	28,0±2,37#	22,3±1,42*
ФХ/ФЕА	2,33±0,18	2,26±0,18	0,97±0,08*	1,24±0,09* ψ	2,02±0,15#	1,94±0,13
Апіраза ²	7,80±0,53	7,71±0,37	4,76±0,35*	5,40±0,39*	7,84±0,41#	6,01±0,43*§
5'-Нуклеотидаза ²	8,76±0,54	8,27±0,42	5,54±0,31*	5,86±0,46*	8,94±0,40#	6,61±0,27*§
Аденозіндезаміназа ²	43,8±4,07	50,0±5,03	68,5±4,21*	69,4±6,67*	48,6±5,92#	52,5±8,87

Примітки:

1. Достовірні відмінності між групами (p<0,05) позначено: * – відносно інтактного контролю, ψ – між 3-ю і 4-ю групами, # – відносно 4-ї групи, § – між 5-ю і 6-ю групами.

2. Активність ензимів – у нмоль/хв·мл.

лічних порушень не реєстрували. Водночас у щурів, які на тлі ОД отримували ВМК (5-та група), рівень ГЦ не лише повертався до норми, а й був на 6-7 % нижчим, ніж в інтактного контролю. Нормалізація рівня ГЦ асоціювалась з відновленням балансу між фракціями цистеїну та фосфоліпідів у плазмі крові, зменшенням дефіциту вазодилаторів та антиагрегантів (H₂S і NO). Введення бетаїну (6-та група) достовірно зменшувало вміст ГЦ і цистеїну в плазмі крові (на 25,0 та 16,3 % відносно тварин 4-ї групи) і викликало позитивну динаміку з боку всіх інших біохімічних показників, однак їх нормалізація (за винятком вмісту ФХ) станом на 23 добу не відбувалась. Отже, за здатністю нормалізувати обмін ГЦ та спряжені з ним метаболічні процеси бетаїн поступався ВМК.

Комплексний аналіз системи гемостазу засвідчив, що станом на 15 добу у тварин з ГГЦ (3-тя група) виявляли ознаки значного дисбалансу в системі гемостазу: скорочувався час згортання крові в тестах ПЧ, АЧТЧ, ТЧ, зростав вміст фібриногену, з'являлась велика кількість РФМК, що вказує на тривалу тром-

бінемію (табл. 2). На тлі гіперкоагуляції зменшувалась (на 28-33 %) активність інгібіторів згортання крові антитромбіну III та протейну С, підвищувався (на 113 %) вміст ПАІ-1 в плазмі крові, збільшувався час лізису еуглобулінів, змінювався морфологічний стан тромбоцитів – збільшувались MPV, ступінь та швидкість АДФ-індукованої агрегації. Зміни гемостазіологічних показників свідчать про розвиток тромбофілії та високий ризик тромбозів за умов гіповітамінозно-метіоїнової ГГЦ.

Застосування ОД протягом 7 діб зменшило дисбаланс у системі гемостазу (4-та група), однак повністю не ліквідувало його: зберігались ознаки високої активності системи згортання крові (ПЧ, АЧТЧ, ТЧ були на 7,7, 16,0 та 12,5 % меншими, ніж в інтактного контролю), вміст фібриногену, РФМК і ПАІ-1 залишався високим, мав місце дефіцит інгібіторів згортання крові та маркерів активації тромбоцитів. Введення ВМК на тлі ОД

Таблиця 2 – Вплив ВМК та бетаїну на показники системи гемостазу в щурів із ГГЦ (n=10, M±m)

Показник	Стан на 15 добу			Стан на 23 добу		
	1-ша група	2-га група	3-тя група	4-та група	5-та група	6-та група
	контроль інтактний	контроль гіповітаміноз	ГГЦ	ГГЦ+ОД	ГГЦ+ОД+ВМК	ГГЦ+ОД+бетаїн
ПЧ, с	18,1±0,31	17,9±0,20	14,3±0,52*	16,7±0,35* ψ	17,7±0,58	16,3±0,20*§
АЧТЧ, с	35,5±1,15	37,2±1,34	27,8±1,97*	29,8±1,15* ψ	35,2±1,42#	30,4±0,98*§
ТЧ, с	10,8±0,36	11,1±0,41	8,20±0,37*	9,45±0,33* ψ	10,5±0,37#	9,65±0,24*
Фібриноген, г/л	2,56±0,12	2,75±0,13	3,54±0,15*	3,08±0,15* ψ	2,71±0,08#	3,03±0,10*§
РФМК, мг/л	0	0	56,5±6,54*	40,0±3,33* ψ	18,5±5,48*#	31,0±2,45*#
Час лізису еуглобулінів, хв	111±2,89	112±2,81	159±3,51*	140±3,94* ψ	116±3,11#	134±4,78*§
Антитромбін III, %	104,4±2,52	102±2,19	75,4±3,22*	86,0±2,53* ψ	99,3±1,78#	91,4±1,93*§
Протейн С, %	101,9±2,38	100±1,12	68,1±3,10*	77,0±3,94* ψ	97,3±2,58#	90,8±2,32*
ПАІ-1, нг/мл	1,61±0,14	1,72±0,10	3,43±0,13*	3,00±0,32*	1,78±0,11#	2,22±0,18*#§
Тромбоцити, тис/мм ³	486±18,3	465±10,1	434±15,6	449±13,6	464±8,06	459±14,3
MPV, фл	6,73±0,17	6,94±0,12	8,01±0,21*	7,99±0,16*	7,34±0,26#	7,37±0,19*#
Ступінь агрегації тромб., %	27,1±1,14	30,2±1,24	62,6±2,91*	44,5±3,00* ψ	23,8±1,33#	33,9±2,84*#§
Швидкість, % за 1 хв	25,6±1,41	24,4±1,30	44,7±2,67*	37,5±2,76*	25,2±0,78#	30,0±1,52*#§

Примітка. Достовірні відмінності між групами (p<0,05) позначено: * – відносно інтактного контролю, ψ – між 3-ю і 4-ю групами, # – відносно 4-ї групи, § – між 5-ю і 6-ю групами.

значною мірою нівелювало ознаки ГГЦ-індукованої гіперкоагуляції – нормалізувались показники ПЧ, АЧТЧ, ТЧ, зменшився вміст фібриногену та РФМК, відновилась активність антитромбіну III та протеїну С, зменшилися порушення морфофункціонального стану тромбоцитів. Бетаїн також сприяв зворотному розвитку ВЗК-синдрому, однак його дія переважно стосувалась тромбоцитарної ланки – зменшився MPV, знизилися ступінь та швидкість агрегації тромбоцитів, також реєстрували зменшення вмісту РФМК і ПАІ-1.

Таким чином, гіпогомоцистеїнемічний та антитромботичний потенціали ВМК виявилися вищими, ніж у бетаїну. На нашу думку, різна ефективність вказаних засобів пояснюється тим, що вітаміни та мікроелементи у складі ВМК потрібні не лише для утилізації ГЦ у шляхах метилювання і транссульфування, а й для широкого кола інших процесів. Так, вітаміни B_9 та B_{12} регулюють гемопоез, ріст і проліферацію клітин, необхідні для синтезу нуклеотидів, обміну амінокислот та ліпідів. Вітамін B_9 підтримує в активній формі один з коферментів ендотеліальної NO-синтази – тетрагідробіоптерин і таким чином регулює продукцію NO [24], а вітамін B_6 необхідний для синтезу в судинах іншого вазодилатора та антиагреганта H_2S [19]. Цинк є активатором нуклеотидаз [16], причому зниження активності 5'-нуклеотидази в плазмі та клітинах крові навіть розглядають як маркер дефіциту цього мікроелемента [23]. В одній з робіт показано, що цинк входить до складу протеїну S (кофактора протеїну С), забезпечує його конформаційну стабільність та антикоагулянтну активність [21].

Разом із тим, спектр дії бетаїну є більш вузьким і його протекторні властивості здебільшого пов'язують з посиленням реметилювання ГЦ (з участю бетаїногемосцистеїнметилтрансферази) та підвищенням відношення S-аденозилметіонін/S-аденозилгомоцистеїн у клітинах [14, 20]. Зокрема, через цей механізм реалізується здатність бетаїну активувати синтез метильованих фосfolіпідів (ФХ) у печінці [14]. Як осмотично активна речовина бетаїн підтримує об'єм клітин, стабілізує структуру протеїнів [22]. Існують дані, що бетаїн зменшує процеси пероксидації ліпідів та запобігає зниженню активності мембранозв'язаної АТФ-ази кардіоміоцитів у щурів з ізопреналіновим інфарктом міокарда [22]. В одній роботі відмічено інгібіторний вплив бетаїну на АДФ-індуковану

агрегацію тромбоцитів людини *in vitro* [13]. Ці факти до певної міри пояснюють виявлену нами спроможність бетаїну переважно нормалізувати морфофункціональний стан тромбоцитарної ланки за ГГЦ. Однак відсутність дієвого впливу бетаїну на інші ланки системи гемостазу обмежує можливість його використання при тромбофіліях, асоційованих з порушеннями обміну САК.

Властивості вітамінних та невітамінних засобів з гіпогомоцистеїнемічною дією, продемонстровані в нашій роботі, відкривають перспективи для створення на їх основі комбінованих метаболічних коректорів та оптимізації фармакотерапії численних патологічних станів, асоційованих із синдромом ГГЦ.

ВИСНОВКИ. 1. За 15-денної гіповітамінозно-метіонінової ГГЦ реєстрували збільшення вмісту ГЦ (у 13,2 раза), загального та непротеїнового цистеїну (в 1,2 і 1,8 раза), зниження вмісту H_2S , стабільних метаболітів оксиду азоту, SH-груп протеїнів, вмісту ФХ та відношення ФХ/ФЕА, порушення активності ензимів нуклеотидного обміну в плазмі крові піддослідних щурів. За цих умов спостерігались ознаки активації системи згортання крові (скорочення ПЧ, АЧТЧ, гіперфібриногенемія, накопичення РФМК), зменшувалась активність антитромбіну III та протеїну С, підвищувався вміст ПАІ-1, формувалась гіперреактивність тромбоцитів.

2. Нормалізація в дієті тварин з ГГЦ вмісту вітамінів B_9 , B_{12} , B_6 і метіоніну сприяла зменшенню ступеня ГГЦ та гіперцистеїнемії, однак не викликала помітного регресу біохімічних та гемокоагуляційних порушень станом на 23 добу досліду. На цьому тлі введення ВМК (71,5 мг/кг маси тіла в/шл 7 діб) нормалізувало вміст ГЦ та цистеїну в плазмі крові, практично нівелювало ознаки дефіциту вазоактивних молекул, гіпометилювання, оксидативного стресу, зменшило прояви дисбалансу в системі гемостазу та порушень морфофункціонального стану тромбоцитів.

3. Бетаїн (450 мг/кг маси тіла в/шл 7 діб) проявляв гіпогомоцистеїнемічний ефект, коригував процеси метилювання, сприяв нормалізації вмісту ПАІ-1, MPV та агрегації тромбоцитів, однак не викликав значної позитивної динаміки інших метаболічних та гемокоагуляційних показників. За гіпогомоцистеїнемічним та антитромботичним ефектами бетаїн поступався ВМК.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Беліцер В.О. Кількісне визначення фібриногену в плазмі крові людини / В.О. Беліцер, Т.В. Варецька, К.М. Веремеєнко // Лаб. діагностика. – 1997. – № 2. – С. 53-57.
2. Біохімічні зміни в крові, печінці та нирках при експериментальній гіпергомоцистеїнемії за її лікування вітамінами та вітамінно-мінеральним комплексом / К.П. Постовітенко, О.О. Пентюк, М.Б. Луцюк [та ін.] // Вісник Вінницького національного медичного університету. – 2005. – **9**, № 2. – С. 222-227.
3. Визначення вмісту гідроген сульфиду в плазмі крові / Н.В. Заїчко, Н.О. Пентюк, Л.О. Пентюк [та ін.] // Вісник наукових досліджень. – 2009. – № 1. – С. 29-32.
4. Владимиров Ю.А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю.А. Владимиров, А.И. Арчаков. – М. : Наука, 1972. – 252 с.
5. Гіпергомоцистеїнемія: моделювання та вплив на стан судинної системи в експерименті / О.О. Пентюк, М.Б. Луцюк, К.П. Постовітенко [та ін.] // Досягнення біології та медицини. – 2004. – № 1 (3). – С. 35-38.
6. Заїчко Н.В. Біохімічні механізми формування тромбофілії, індукованої хронічним навантаженням тіолактоном гоцистеїну та його комбінацією з L-NAME. Корекція вітамінно-мікроелементним комплексом / Н.В. Заїчко // Вісник проблем біології та медицини. – 2010. – № 1. – С. 126-132.
7. Заїчко Н.В. Окислювальна модифікація білків сироватки крові як маркер активності ревматоїдного артриту та її зміни під впливом фармакотерапії амізоном, індометацином, німесулідом / Н.В. Заїчко // Вісник Вінницького державного медичного університету. – 2003. – № 7 (2/2). – С. 664-666.
8. Коренман И.М. Методы определения органических соединений / И.М. Коренман. – М. : Химия, 1975. – 360 с.
9. Пентюк О.О. Вітаміни В₉, В₁₂ та В₆, поліморфізм ферментів їх обміну, зв'язок з метаболізмом гоцистеїну, роль в патології. Ренесанс клінічної вітамінології / О.О. Пентюк, М.Б. Луцюк, І.І. Андруш-ко // Мед. хімія. – 2007. – **9**, № 1. – С. 122-127.
10. Рыбальченко В.К. Структура и функции мембран : практикум / В.К. Рыбальченко, М.М. Коганов. – К. : Выща шк., 1988. – 312 [239-241] с.
11. Современные методы в биохимии / под ред. В.Н. Ореховича – М. : Медицина, 1968. – 372 [121-123] с.
12. B-vitamin deficiency causes hyperhomocysteinemia and vascular cognitive impairment in mice / A. Troen, M. Shea-Budgell, B. Shukitt-Hale [et al.] // PNAS. – 2008. – **105**, № 34. – P. 12 474-12 479.
13. Betaine, a novel antithrombotic agent for effective management of peripheral arterial occlusive diseases / O. Iqbal, J. Messadek, C. Schultz [et al.] // FASEB J. – 2006. – **20**. – P. 656.
14. Betaine attenuates alcoholic steatosis by restoring phosphatidylcholine generation via the phosphatidylethanolamine methyltransferase pathway / K.K. Kharbanda, M.E. Mailliard, C.R. Baldwin [et al.] // J. Hepatol. – 2007. – **46**, № 2. – P. 314-321.
15. Brain ischemia alters platelet ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase activities in naive and preconditioned rats / S.S. Frassetto, M.R. Schetinger, R. Schierholt [et al.] // Braz. J. Med. Biol. Res. – 2000. – **33**, № 11. – P. 1369-1377.
16. Davis C.D. Changes in dietary zinc and copper affect zinc-status indicators of postmenopausal women, notably, extracellular superoxide dismutase and amyloid precursor proteins / C.D. Davis, D.B. Milne, F.H. Nielsen // Am. J. Clin. Nutr. – 2000. – **71**, № 3. – P. 781-788.
17. Ebbesen L.S. Hyperhomocysteinemia due to folate deficiency is thrombogenic in rats // L.S. Ebbesen, K. Christiansen, J. Ingerslev // J. Nutr. – 2003. – **133**. – P. 2250-2255.
18. Gaitonde M.K. A spectrophotometric method for direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acid / M.K. Gaitonde // Biochem. J. – 1967. – **104**, № 2. – P. 627-633.
19. Lowicka E. Hydrogen sulfide (H₂S) - the third gas of interest for pharmacologists / E. Lowicka, J. Beltowski // Pharmacol. Rep. – 2007. – **59**, № 1. – P. 4-24.
20. Olthof M.R. Effects of betaine intake on plasma homocysteine concentrations and consequences for health / M.R. Olthof, P. Verhoef // Current Drug Metabolism. – 2005. – № 6. – P. 15-22.
21. Plasma protein S contains zinc essential for efficient activated protein C-independent anticoagulant activity and binding to factor Xa, but not for efficient binding to tissue factor pathway inhibitor / M.J. Heeb, D. Prashun, J.H. Griffin, B.N. Bouma // FASEB J. – 2009. – **23**, № 7. – P. 2244-2253.
22. Protective effect of betaine on changes in the levels of protein, glycoproteins and amino acids in isoprenalineinduced myocardial infarction in rats / B. Ganesan, R. Rajesh, R. Anandan, N. Dhandapani // African Journal of Biochemistry Research. – 2007. – **1**, № 6. – P. 117-123.
23. Research on some enzyme activities in the assessment of zinc nutritional status of growing rats / S. Zhou, J. Piao, J. Xu, X. Yang // Wei Sheng Yan Jiu. – 1999. – **28**, № 5. – P. 283-285.
24. Tian R. How does folic acid cure heart attacks? / R. Tian, J.S. Ingwall // Circulation. – 2008. – **117**, № 14. – P. 1772-1774.

ВЛИЯНИЕ ВИТАМИННО-МИКРОЭЛЕМЕНТНОГО КОМПЛЕКСА И БЕТАИНА НА СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА У КРЫС С ГИПОВИТАМИНОЗНО-МЕТИОНИНОВОЙ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИЕЙ

Резюме

Исследовано влияние витаминно-микроэлементного комплекса (ВМК) и бетаина на состояние системы гемостаза, уровень серосодержащих аминокислот в плазме крови и другие биохимические показатели у крыс с гиповитаминозно-метиониновой гипергомоцистеинемией (ГГЦ). Показано, что введение ВМК (71,5 мг/кг интрагастрально) в течение 7 дней нормализует содержание гомоцистеина и цистеина в плазме крови, вызывает регресс ГГЦ-индуцированных метаболических нарушений, восстанавливает равновесие в системе гемостаза. Бетаин (450 мг/кг интрагастрально) снижает степень ГГЦ, активирует процессы метилирования, уменьшает проявления гиперреактивности тромбоцитов. По гипогомоцистеинемическому и антитромбогенному эффектам бетаин уступает ВМК.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гипергомоцистеинемия, гемостаз, тромбофилия, витаминно-микроэлементный комплекс, бетаин.

N.V. Zaichko, M.A. Artemchuk
PYROHOV VINNYTSIA NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY

INFLUENCE OF VITAMINS-MICROELEMENT COMPLEX AND BETAINE ON HEMOSTASIS SYSTEM IN RATS WITH HYPOVITAMINOSIS-METHIONINE HYPERHOMOCYSTEINEMIA

Summary

Influence of vitamin-microelement complex (VMC) and betaine on hemostasis system, sulfur aminoacids in blood plasma and other biochemical markers in rats with hypovitaminosis-methionine hyperhomocysteinemia (HHC) was investigated. It was established that VMC administration (71,5 mg/kg per os) reduced homocysteine and cysteine in blood plasma, HCC-induced metabolic abnormalities, restored hemostasis balance. Betaine (450 mg/kg per os) lowered degree of HCC, activated methylation, decreased platelet hyperactivity. Betaine hypohomocysteinemic and antithrombotic effects were significantly lower than VMC effects.

KEY WORDS: hyperhomocysteinemia, hemostasis, thrombophilia, vitamin-microelement complex, betaine.

Отримано 29.09.10

Адреса для листування: Н.В. Заичко, Науково-дослідний інститут реабілітації інвалідів, Хмельницьке шосе, 104, Вінниця, 21029, Україна.

І.І. Романовська, О.В. Осійчук¹, С.С. Декіна, Ю.А. Шестеренко, О.В. Севастьянов
 ФІЗИКО-ХІМІЧНИЙ ІНСТИТУТ ІМЕНІ О.В. БОГАТСЬКОГО НАН УКРАЇНИ, ОДЕСА
 ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ДОСЛІДЖЕННЯ ПЕРОКСИДАЗНОГО ОКИСНЕННЯ ФЕНОЛЬНИХ ПОЛЮТАНТІВ

У статті наведено модифікацію методу виділення пероксидази хрону, вивчено білково-фракційний склад отриманого препарату, оптимізовано умови каталізу ряду фенольних полютантів, ідентифіковано продукти біоконверсії фенолу, досліджено соокиснення субстратів у реакції дефенолізації, показано стабілізуювальну дію водорозчинних полімерів (полі-N-вінілпіролідону, ПЕГ-6000) та білка (бичачого сироваткового альбуміну) на активність ферменту.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: пероксидаза, фенольні полютанти, біоконверсія, соокиснення субстратів, поліоксибенілені.

ВСТУП. Феноли та їх похідні – основний клас забруднювачів індустриальних стічних вод. Ця проблема має глобальний характер та є актуальною і для України. ГДК фенолів у стічних водах варіюють від 0,001 до 0,1 мг/дм³ [9]. Методи, які використовують для видалення фенольних сполук, недостатньо ефективні, дорогі, в ряді випадків сприяють утворенню побічних і навіть більш токсичних продуктів [2]. Використання ферментативного методу із застосуванням пероксидази хрону (ПОХ) відкриває перспективи ефективнішої утилізації широкого спектра фенольних сполук завдяки утворенню нерозчинних продуктів окиснення, можливості використовувати ензим в широких інтервалах рН, температур і концентрацій субстратів [14, 15], а також створення біосенсорів для визначення концентрації фенолу в розчинах та біологічних рідинах в біології і медицині тощо.

Пероксидаза (КФ 1.11.1.7) – кальцієвмісний гемоглікопротеїд (М.м. 40 кДа), за присутності пероксиду водню, хлориту натрію і ряду органічних гідропероксидів каталізує окиснення різноманітних хімічних сполук (ароматичні вуглеводні, галогенозаміщені аліфатичні й ароматичні сполуки тощо), в тому числі фенолів [16]. Однак, згідно з даними проведених раніше досліджень [10, 11], перспективним є використання для окиснення фенольних полютантів більш доступного, частково очищеного препарату ПОХ.

Метою роботи було дослідити процес окиснення фенольних сполук, що каталізується виділеною з коренів хрону пероксидазою.

© І.І. Романовська, О.В. Осійчук, С.С. Декіна, Ю.А. Шестеренко, О.В. Севастьянов, 2010.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. У роботі використовували бичачий сироватковий альбумін (БСА) (“Sigma”), пероксидазу хрону (“Sigma”), полі-N-вінілпіролідон (ПВП) (М.м. 2·10⁶), поліетиленгліколь (ПЕГ-6000) (“Merk”).

Білок визначали методами Лоурі-Хартрі [13], феноли – 4-аміноантипіриновим, фенантроліновим методами [4]. ПОХ виділяли за модифікованим нами методом Баха [8]: використовували для виділення баластних білків менший об’єм етанолу ($V_{\text{екстракту}}:V_{\text{етанолу}}=1:2$ замість 1:3) і вводили на заключному етапі 2 стадії діалізу проти Na-фосфатного буферного розчину (рН 7,0, t 4 °С, τ 4 год).

SDS-електрофорез проводили в 15 % ПААГ згідно з [3]. Молекулярні маси досліджуваних білків розраховували за калібрувальною кривою “відносна електрофоретична рухливість/Ig молекулярної маси (кДа)”, побудованою з використанням таких маркерних білків, як: цитохром с (13 кДа), лізоцим (14,4 кДа), міоглобін (18 кДа), овальбумін (40 кДа), бичачий сироватковий альбумін (67 кДа).

Концентрацію ПОХ та пероксиду водню визначали спектрофотометрично [1]. За одиницю пероксидазної активності брали таку кількість ферменту, яка каталізує утворення 1 мг пурпурогаліну з пірогалолу за 1 хв при рН 6,0 і 20 °С. Вплив концентрації фенолів (0,1-3,0 ммоль/дм³) на ступінь їх окиснення досліджували при активності ферменту 0,05-3,0 од./мг.

Кінетику гідролізу субстратів ПОХ досліджували за початковими швидкостями з лінеаризацією даних у координатах Хейнса [5].

У роботі як стабілізатори активності ПОХ використовували 1 % водні розчини ПЕГ-6000, БСА і ПВП. Число каталітичних обертів пероксидази (“Sigma”) визначали згідно з [17].

Мас-спектрометричні дослідження було виконано в Центрі колективного користування приладом "Мас-спектрометричний комплекс із лазерною десорбцією та іонізацією Autoflex II" в Інституті хімії поверхні імені О.О. Чуйка НАН України. Застосовували методику лазерної/десорбційної іонізації. Зразок, розчинений у диметилсульфоксиді, наносили на стандартну сталеву мішень та висушували при кімнатній температурі. Отриманий мас-спектр є сумою окремих 30 спектрів. Спектри отримано в рефлекторному режимі.

Експериментальні дані оброблено методами варіаційної статистики. Число експериментів у серіях досліджень становило 6-10. Коефіцієнти лінійної кореляції перевищували 99 %.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. З метою оптимізації якісних та кількісних характеристик ПОХ нами запропонована модифікація методу Баха, що дозволяє збільшити RZ ферменту з 0,6 до 1,0, активність – на 13 %.

Результати вивчення характеристик отриманої ПОХ модифікованим методом та порівняння з комерційним препаратом за молекулярно-масовим складом свідчать про їх досить близькі властивості, за винятком ступеня чистоти, строків зберігання. Встановлено, що обидва ферменти за спектром білкових фракцій суттєво не відрізняються; різниця пов'язана з кількістю окремих фракцій. Так, на електрофореграмі препаратів ПОХ можна виділити 6 зон (рис. 1). Найбільш однорідна і переважна фракція в обох препаратах (№ 4) має значення відносної електрофоретичної рухливості 0,10, що відповідає молекулярній масі 40-45 кДа. Кількісно ця фракція, як у частково очищеному, так і в комерційному препараті ферменту, становить понад 25 %. Відмінності між препаратами стосуються зон спектра, прилеглих до зазначеної головної фракції.

Розроблено умови ПОХ-окиснення фенолу, резорцину, пірокатехіну, гідрохінону, пірогалолу, *o*-, *m*-, *p*-хлорфенолів, 2,4,6-трихлорфенолу, пентахлорфенолу, *o*-, *m*-, *p*-крезолів, α -нафтолу, що призводять до максимального ступеня біоконверсії (20,4-94,1 %) в діапазоні концентрацій 0,1-1,0 мМ при мольних відношеннях субстрат: H_2O_2 1:1, [ПОХ]: 0,01-0,2 од./см³, рН 4,0-7,5, t 20-45 °С, τ 30-60 хв. Визначено кінетичні параметри (K_m , V_{max}) реакції окиснення досліджуваних фенольних полютантів (табл. 1). Порівняльний аналіз окиснення широкого ряду фенольних сполук, що каталізується виділеною і комерційною ПОХ, показав незначний вплив спектрального ступеня чистоти ферменту (RZ), що узгоджується з даними літератури [17].

У результаті проведених нами досліджень показано, що при пероксидазному окисненні фенолу, *o*-, *m*-, *p*-крезолів, *o*-, *m*-, *p*-хлорфенолів, 2,4,6-трихлорфенолу утворюються полімерні продукти темно-коричневого кольору (розмір часток – 15-75 мкм), не розчинні у воді, діетиловому ефірі, етанолі, хлороформі, бензолі, воді, малорозчинні при нагріванні у диметилформаміді й диметилсульфоксиді та обуглюються при температурі 240-260 °С. В ІЧ-спектрах (у вазеліновому маслі) продуктів перок-

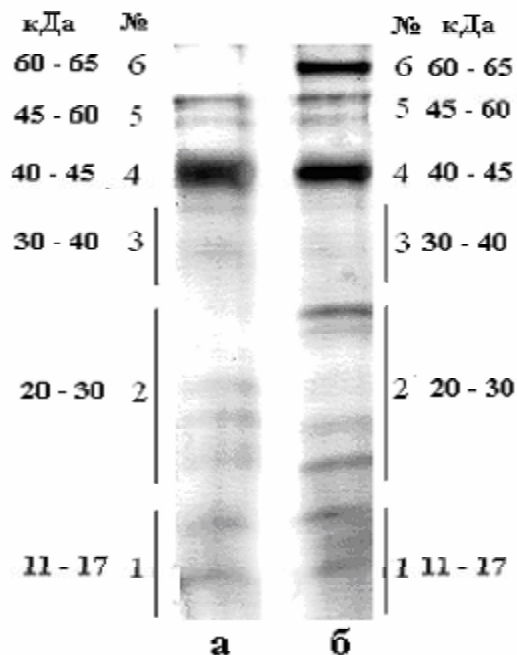
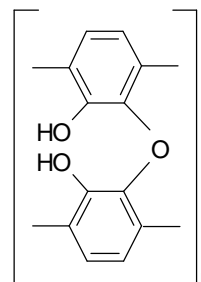


Рис. 1. Електрофореграми препаратів ПОХ: а – комерційна ПОХ (RZ 2,7); б – частково очищений препарат ПОХ (RZ 1,0).

сидазного окиснення фенолу та його хлорпохідних спостерігаються смуги поглинання гідроксильних груп фенолу в ділянці 3400-3200 см⁻¹, 1335 см⁻¹, 1180 см⁻¹, ефірного зв'язку -C-O-C-, що належать до ароматичного ефіру, при 1200 см⁻¹ для продукту окиснення фенолу, 1093 см⁻¹ – 2,4,6-трихлорфенолу і 1027 см⁻¹ – пентахлорфенолу, смуги поглинання ароматичного кільця при 1485, 1590, 3060 см⁻¹ відповідно. Отримані результати дозволяють припустити утворення поліоксифеніленів з переважною структурою ланцюга:



Таблиця 1 – Біоконверсія фенолів і кінетичні параметри каталізу

Фенольна сполука	Ступінь конверсії, %	K_m (ArROH), мМ	K_m (H ₂ O ₂), мМ	V_{max} , мМ/мг білка за 1хв
фенол	80,4	0,413	0,652	$39,3 \cdot 10^{-3}$
резорцин	75,0	0,330	0,408	$76,4 \cdot 10^{-3}$
пірокатехін	84,3	0,320	0,360	$84,3 \cdot 10^{-3}$
гідрохінон	92,1	0,378	0,310	$136,3 \cdot 10^{-3}$
о-хлорфенол	68,1	0,172	0,380	$74,9 \cdot 10^{-6}$
м-хлорфенол	25,2	0,156	0,309	$10,3 \cdot 10^{-6}$
п-хлорфенол	71,0	0,173	0,362	$23,5 \cdot 10^{-5}$
α-нафтол	94,1	0,382	0,270	$142,1 \cdot 10^{-3}$
о-крезол	78,1	0,310	0,421	$69,0 \cdot 10^{-3}$
м-крезол	76,5	0,311	0,402	$71,3 \cdot 10^{-3}$
п-крезол	91,2	0,286	0,133	$80,3 \cdot 10^{-3}$
2,4,6-трихлорфенол	62,0	0,174	0,284	$41,2 \cdot 10^{-3}$
пентахлорфенол	20,4	0,123	0,312	$31,2 \cdot 10^{-7}$

На рисунку 2 показано ЛДІ-мас-спектр продукту пероксидазного окиснення фенолу. В мас-спектрі спостерігається серія групи піків з послідовністю у 92 m/z, в якій центральний,

найбільш інтенсивний іон (M_n) має піки-сателіти зі значеннями M_n-18 та M_n+15 , що є підтвердженням утворення поліоксифенілену (C₆H₄O)_n. Найбільш достовірно зафіксоване

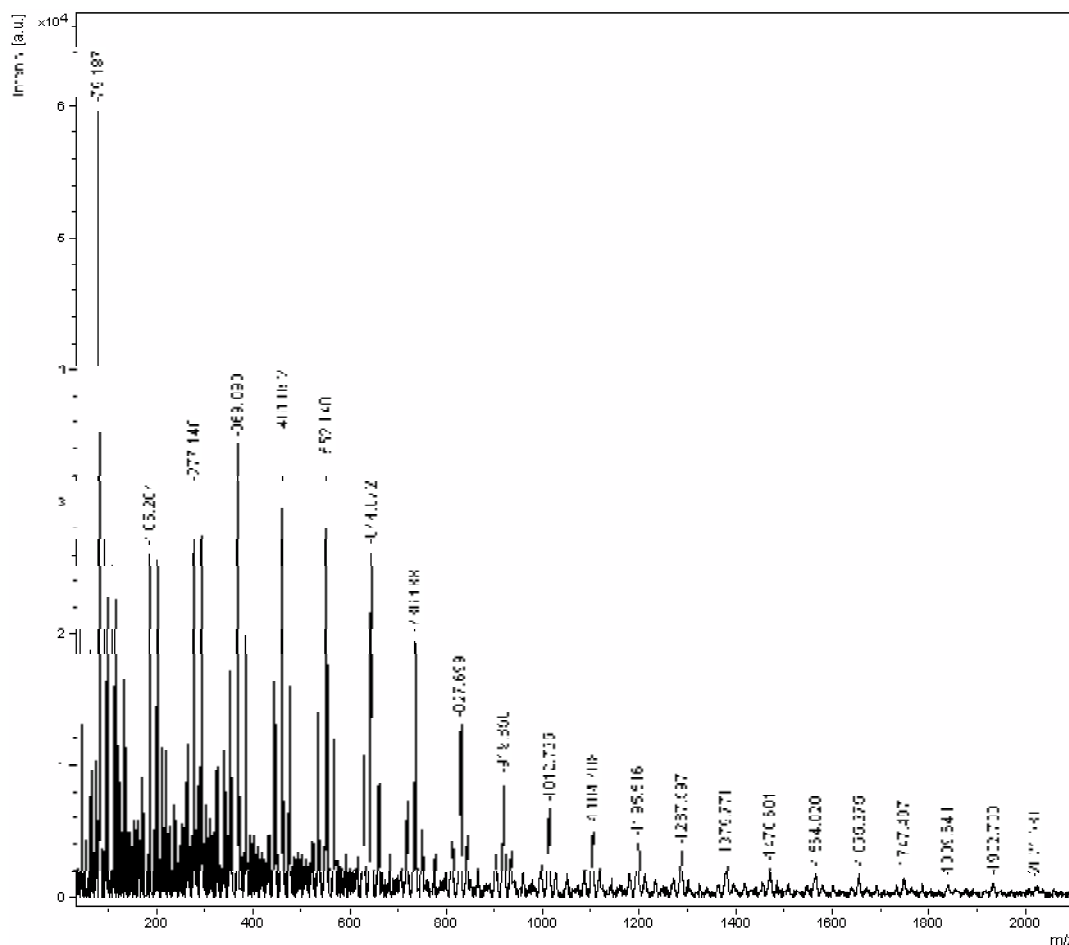


Рис. 2. Мас-спектр продукту пероксидазного окиснення фенолу ([фенол]=1,0 мМ, [H₂O₂]=1,0 мМ, активність ПОХ 0,1 од./см³, рН 7,0, t=37 °С, τ=1 год).

значення m/z центрального піку становить 2021. Це дає підстави припустити, що ланцюг поліоксифенілену складається, принаймні, з 21 залишку.

Відомо, що субстрати ПОХ (о-діанізидин, α -нафтол, 2,3-диметилфенол, 8-гідроксихінолін), які швидко окиснюються, значною мірою сприяють ферментативному каталізу фенолів (фенол, 2,4-дихлорфенол, 2,4,6-трихлорфенол, пентахлорфенол та ін.), що окиснюються повільно [6, 7], і осадженню продуктів окиснення.

Механізм цього явища полягає в утворенні фенолами, які швидко окиснюються, полімерного осаду з М.м., що перевищує таку продуктів окиснення фенолів, що окиснюються повільно, або фенолів, які не утворюють осадів.

Підвищити ступінь біоконверсії поліютантів (фенолу, *o*-, *m*-крезолів, *o*-, *m*-, *n*-хлорфенолів, 2,4,6-трихлорфенолу, пентахлорфенолу), що окиснюються повільно, з 20,4-80,4 % до 60,5-100 % вдалося, використовуючи метод соокис-

нення субстратів, вперше застосувавши субстрати ПОХ – похідні хіноліну (8-гідроксихінолін-3-сульфо кислота, 8-гідроксихінолін-5-сульфо кислота, 5,7-дибром-8-гідроксихінолін, 2,4-дигідроксихінолін), які швидко окиснюються (табл. 2).

При пероксидазному окисненні фенолів нерозчинні полімерні продукти шляхом гідрофобної взаємодії між собою утворюють мікроагрегати, які інактивують ПОХ. Введені в розчин ПВП, ПЕГ і БСА стають центрами енуклеації, що утворюються в процесі реакції полімерів і оберігають молекули ферменту від адсорбції мікроагрегатів. За відсутності таких полімерів і БСА центрами енуклеації є молекули ферменту [12].

Застосування стабілізаторів (БСА, ПЕГ-6000, ПВП) призвело до збільшення трансформації фенолу, *o*-, *m*-, *n*-хлорфенолів у середньому на 10-17 % (рис. 3).

Таблиця 2 – Вплив похідних хіноліну на біоконверсію фенолів, які окиснюються повільно

Фенольна сполука	Конверсія повільно окиснюваних фенолів за присутності швидко окиснюваних сполук, %				
	-	8-гідроксихінолін-3-сульфо кислота	8-гідроксихінолін-5-сульфо кислота	5,7-дибром-8-дигідроксихінолін	2,4-дигідроксихінолін
фенол	80,4	95,2	97,3	100	100
<i>o</i> -крезол	78,1	96,0	97,0	100	100
<i>m</i> -крезол	76,5	95,1	95,2	100	100
резорцин	75,0	90,1	91,6	95,0	97,2
<i>o</i> -хлорфенол	68,1	90,0	94,4	92,7	97,6
<i>m</i> -хлорфенол	25,2	60,7	63,1	64,9	70,1
<i>n</i> -хлорфенол	71,0	93,0	96,4	100	100
2,4,6-трихлорфенол	62,0	85,3	88,1	92,6	95,3
пентахлорфенол	20,4	60,5	65,3	69,0	74,3

Примітка. * – [похідні хіноліну]=0,5 мМ, [фенольний субстрат]=1,0 мМ, [H₂O₂]=1,0 мМ, активність ПОХ 0,1 од./см³, рН 7,0, t=37 °С, τ =1 год.

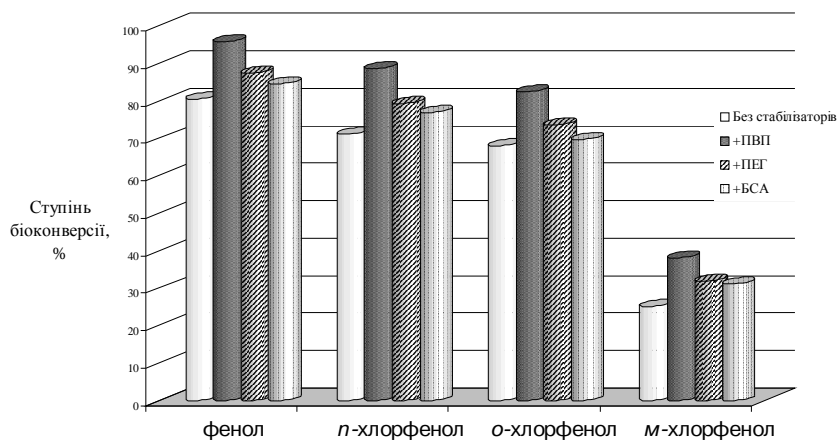


Рис. 3. Вплив ПВП, ПЕГ, БСА на кратність використання ПОХ, вміщеної в мембрану, в реакції окиснення фенолу ([фенольний субстрат]=1,0 мМ, [H₂O₂]=1,0 мМ, 1,0 % розчини стабілізаторів, активність ПОХ 0,1 од./см³, рН 7,0, t=37 °С, τ =30 хв).

ВИСНОВКИ. У результаті проведеного дослідження модифіковано метод виділення ПОХ, що дозволяє отримувати частково очищений ферментний препарат, наближений за властивостями до комерційного препарату ПОХ. Оптимізовано умови каталізу ряду фенольних поллютантів, показано можливість підвищення їх елімінації шляхом додавання стабілізаторів. Підвищити ступінь біо-

конверсії повільно окиснюваних фенольних поллютантів вдалося, використовуючи метод соокиснення субстратів, вперше застосувавши швидко окиснювані похідні хіноліну. Показано, що виділений фермент з високою ефективністю каталізує окиснення ряду похідних фенолу з утворенням нерозчинних полімерних осадів – поліоксифеніленів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Асатиани В.С. Новые методы биохимической фотометрии. – М.: Наука, 1965. – 544 с.
2. Дмитренко Г.Н. Бескислородные микробные процессы в очистке воды // Химия и технология воды. – 2005. – **27**, № 1. – С. 85-91.
3. Духин С.С., Дерягин Б.В. Электрофорез. – М.: Наука, 1976. – 332 с.
4. Коренман И.М. Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений. – М.: Химия, 1975. – 360 с.
5. Корниш-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики. – М.: Мир, 1979. – 280 с.
6. Литвинчук А.В., Савенкова М.И., Метелица Д.И. Кинетика сопряженного пероксидазного окисления фенола с 4-аминоантипиринами // Кинетика и катализ. – 1991. – **32**. – С. 535-540.
7. Метелица Д.И., Арапова Г.С., Демчева М.В., Разумас В.И. Сопряженное окисление фенолов и 4-аминоантипирин, катализируемое микропероксидазами и их комплексами с белками // Биохимия. – 1994. – **59**. – С. 1285-1298.
8. Михлин Д.М. Биологическое окисление. – М.: Изд-во Академии наук СССР, 1956. – 442 с.
9. Проблема сбора, переработки и утилизации отходов: Сб. научных статей. – Одесса: ОЦНТЭИ, 2001. – С. 83-87.
10. Alberti B.N. Enzymatic removal of toxic phenols and anilines from waters // J. Appl. Biochem. – 1980. – **2**. – P. 414-421.
11. Alberti B.N., Klivanov A.M. Enzymatic removal of dissolved aromatics from industrial aqueous effluents // Biotechnol. and Bioeng. Symp. – 1981. – **11**. – P. 373-379.
12. Dunford H.B. Peroxidases in chemistry and biology // CRC Press. – 1991. – **2**. – P. 1-24.
13. Hartree E.E. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response // Anal. Biochem. – 1972. – **48**, № 1. – P. 422-427.
14. Klivanov A.M. Horseradish peroxidase for the removal of carcinogenic aromatic amines from water // Enzyme Microb. Technol. – 1981. – **3**. – P. 119-122.
15. Laurenti E. Oxidation of 2,4-dichlorophenol catalyzed by horseradish peroxidase: characterization of the reaction mechanism by UV-visible spectroscopy and mass spectrometry // Journal of Inorganic Biochemistry. – 2000. – **95**. – P. 171-176.
16. Veitch N.C. Horseradish peroxidase // Adv. Inorg. Chem. – 2001. – **51**. – P. 107-162.
17. Wagner M., Nicell J.A. Detoxification of phenolic solutions with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide // Water Res. – 2002. – **36**. – P. 4041-4052.

И.И. Романовская, О.В. Осийчук¹, С.С. Декина, Ю.А. Шестеренко, О.В. Севастьянов
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ ИМЕНИ О.В. БОГАТСКОГО НАН УКРАИНЫ, ОДЕССА
ОДЕССКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕРОКСИДАЗНОГО ОКИСЛЕНИЯ ФЕНОЛЬНЫХ ПОЛЮТАНТОВ

Резюме

В статье приведена модификация метода выделения пероксидазы хрена, изучен белково-фракционный состав полученного препарата, оптимизированы условия катализа ряда фенольных поллютантов, идентифицированы продукты биоконверсии фенола, исследовано соокисление субстратов в реакции дефенолизации, показано стабилизирующее действие водорастворимых полимеров (поли-N-винилпирролидона, ПЭГ-6000) и белка (бычьего сывороточного альбумина) на активность фермента.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: пероксидаза, фенольные поллютанты, биоконверсия, соокисление субстратов, полиоксифенилены.

I.I. Romanovska, O.V. Osiychuk, S.S. Dekina, Yu.A. Shesterenko, O.V. Sevastyanov
O.V. BOHATSKYI PHYSICO-CHEMICAL INSTITUTE OF NAS OF UKRAINE, ODESSA
ODESSA NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY, ODESSA

THE RESEARCH OF PEROXIDASE OXIDATION OF PHENOLIC POLLUTANTS

Summary

In the work it has been given the modification of discharge method of horseradish peroxidase, it has been studied protein-fractional composition of received preparation, it has been optimized the conditions of catalysis of a number of phenolic pollutants, it has been identified the products of phenol bioconversion, it has been researched oxidation of substrates in the reaction of dephenolisation, it has been shown the stabilizing effect of water-soluble polymers (poli-N-vinylpyrrolidone, PEG – 600) and protein (bovine serum albumin) on the activity of enzyme.

KEY WORDS: **peroxidase, phenolic pollutants, bioconversion, oxidation of substrates, polioxyphenilens.**

Отримано 24.11.10

Адреса для листування: *I.I. Романовська, Фізико-хімічний інститут імені О.В. Богатського НАН України, Люстдорфська дор., 86, Одеса, 65080, Україна.*

ВПЛИВ МОДУЛЯТОРІВ АКТИВНОСТІ СИСТЕМИ ОКСИДУ АЗОТУ НА ВМІСТ НІТРИТ-АНІОНА У СЕРЦІ ЩУРІВ РІЗНОЇ СТАТІ ПРИ АДРЕНАЛІНОВОМУ ПОШКОДЖЕННІ

У досліджах на статевозрілих самцях і самках щурів вивчено вплив донатора (L-аргїнін) і блокатора (L-NAME) синтезу оксиду азоту (NO) на динаміку вмісту в крові та міокарді стабільного метаболіту оксиду азоту нітрит-аніона (NO₂⁻) за умов пошкодження міокарда адреналїном (1 мг/кг, внутрішньом'язово, одномоментно). Тварин спостерїгали на 1 та 24 год після введення адреналїну. Встановлено, що розвиток некротичного процесу на тлі L-аргїніну і L-NAME викликає зниження вмісту NO₂⁻ в міокарді передсердь, особливо на 1 год експерименту. В міокарді шлуночків на 1 год експерименту вміст NO₂⁻ зменшувався, а на 24 год відбувалося його зростання до вихідного рівня. Встановлені ефекти виявляли при застосуванні як L-аргїніну, так і L-NAME. Більш інтенсивною динаміка була за використання L-NAME, і чутливішими до ефектів застосованих модуляторів виявилися самці.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: міокард, стать, некроз, оксид азоту, нітрит-анїон.

ВСТУП. Дослідженнями останніх років показано, що одним із чинників, які визначають наслідки негативних впливів на міокард, є стан стреслімітуючих систем організму, серед яких чинне місце займає система оксиду азоту. Отримано численні дані про те, що стреслімітуючі ефекти оксиду азоту пов'язані зі здатністю пригнічувати адренергічну стимуляцію, сприяти холінергічним ефектам, вазорелаксації і тим самим забезпечувати захист серця та судин за умов ішемії, гіпоксії чи стресу [2, 5]. Вазодилатуюча активність оксиду азоту зумовлена його вивільненням при біотрансформації органічних нітратів, амінокислоти аргїніну та іншими шляхами [10]. Малі розміри і відсутність заряду забезпечують оксиду азоту високу проникність через мембрани клітин та субклітинних структур і регуляцію центральної та автономної нервової системи, діяльність серця, тонуус гладеньких м'язів у стїнці судин [6]. Експериментальні та клінічні дослідження доводять істотний кардіопротекторний вплив статевих гормонів, притаманний як естрогенам [3, 4, 11], так і тестостерону [9]. Саме тому для вивчення природи статевого диморфізму в кардіоваскулярній стійкості до стресу необхідне дослідження з урахуванням статевих відмінностей центральних і периферичних механїзмів регуляції активності серцево-судинної системи. Проте отримані дані, як

правило, мають суперечливий характер, і в авторів немає єдиної думки про роль системи оксиду азоту в патогенезі некротичного пошкодження міокарда. А дослідження, які ґрунтуються на вивченні статевого аспекту даної проблеми, є нечисленими.

Метою дослідження було з'ясувати гендерні відмінності активності метаболізму оксиду азоту при моделюванні адреналїнового пошкодження міокарда на тлі донатора NO (L-аргїніну) та блокатора NO-синтази (L-NAME).

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди провели на білих лабораторних статевозрілих самцях (♂) і самках (♀) щурів (170–210 г), в яких моделювали адреналїнове пошкодження міокарда (АПМ) внутрішньом'язовим введенням адреналїну (1 мг/кг). Для оцінки активності системи оксиду азоту було проведено визначення концентрації його стабільного метаболіту – нітрит-аніона в міокарді передсердь, шлуночків та сироватці крові спектрофотометричним методом з використанням реактиву Гріса [8]. Активацію системи оксиду азоту викликали шляхом внутрішньоочеревинного введення L-аргїніну (600 мг/кг) за 15 хв до початку АПМ, блокування – введенням L-NAME (NG-Nitro-L-arginine-methyl ester hydrochloride, 98 %, 25 мг/кг) за аналогічною схемою. Тварин подїлили на 3 групи (1-ша – щури з АПМ без корекції; 2-га – щури з АПМ, що розвивалося на тлі L-аргїніну; 3-тя – щури

з АПМ, що розвивалося на тлі L-NAME) і спостерігали на 1 та 24 год після ін'єкції адреналіну. Отримані дані представлено у вигляді середніх величин з урахуванням похибки. Різницю між даними окремих груп вважали суттєвою при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Аналіз динаміки даного показника в міокарді передсердь показав, що на 1 год експерименту в

1-й групі він знизився на 36 % у ♂ та на 29 % у ♀ (табл.). Така ж динаміка була і через добу після введення адреналіну. Зменшення вмісту NO_2^- проти контролю становило 78 % у ♂ та 79 % у ♀. Такі зміни можуть бути спричинені дією адреналіну, який пригнічує перехід NO в його кінцевий метаболіт NO_2^- внаслідок гіпоксії та утворення NO, як результат кардіо- та вазотоксичного впливу метаболітів адреналіну

Таблиця – Динаміка концентрації нітрит-аніона (ммоль/кг) в міокарді та сироватці крові (ммоль/л) при розвитку некротичного процесу в міокарді ($M \pm m$)

Група		Контроль	АПМ (1 год)	АПМ (24 год)
міокард передсердь				
♂	Без корекції	4,39±0,09	2,82±0,11*	0,96±0,07*
♀	Без корекції	4,24±0,06	3,03±0,08*	0,90±0,06*
♂	L-аргінін	2,39±0,08	2,03±0,03*	2,11±0,02*
♀	L-аргінін	2,34±0,04	2,07±0,02*	2,10±0,04*
♂	L-NAME	2,26±0,04	0,91±0,02*	1,60±0,15* #
♀	L-NAME	2,25±0,10	0,94±0,03*	1,19±0,05* #
міокард шлуночків				
♂	Без корекції	4,22±0,10	2,97±0,17*	0,66±0,06*
♀	Без корекції	4,42±0,22	2,98±0,12*	0,70±0,06*
♂	L-аргінін	2,43±0,04	1,77±0,03*	3,20±0,10* #
♀	L-аргінін	2,33±0,04	1,79±0,03*	2,68±0,12* #
♂	L-NAME	2,06±0,28	0,70±0,03*	2,03±0,17
♀	L-NAME	2,29±0,13	0,72±0,04*	2,09±0,12
сироватка крові				
♂	Без корекції	5,63±0,31	4,68±0,17*	5,55±0,23*
♀	Без корекції	5,52±0,23	4,66±0,14*	5,00±0,15
♂	L-аргінін	3,75±0,09	3,07±0,04*	4,09±0,03*
♀	L-аргінін	3,90±0,17	3,16±0,09*	4,04±0,05
♂	L-NAME	3,30±0,12	3,86±0,13*	3,69±0,17
♀	L-NAME	3,27±0,14	3,83±0,16*	3,51±0,15

Примітка. * – достовірна відмінність відносно контролю ($p < 0,05$); # – достовірна відмінність відносно тварин іншої статі ($p < 0,05$).

(семихінону). Порівнюючи зміни показника в групах тварин різної статі, суттєвої різниці між ними не спостерігали.

При розвитку АПМ на тлі L-аргініну (2-га група тварин) концентрація NO_2^- в міокарді передсердь на 1 год експерименту знижувалась, дефіцит даного метаболіту був значно меншим і становив 15 % у ♂ та 12 % у ♀, а через добу – 12 та 10 % відповідно.

При використанні L-NAME (3-тя група тварин) концентрація NO_2^- на 1 год АПМ знижувалася на 60 % у ♂ та на 58 % у ♀. На 24 год даний показник зростає, але, незважаючи на таку динаміку, дефіцит метаболіту в міокарді передсердь тварин обох статей зберігався, що в ♂ становило 29 %, а в ♀ – 47 % відносно контролю. Порівнюючи показники самців і самок, встановили, що відновлення вмісту да-

ного метаболіту в міокарді передсердь на 24 год АПМ у ♀ відбувалося інтенсивніше, ніж у ♂.

Через 1 год після введення адреналіну вміст NO_2^- в міокарді шлуночків ♂ знизився на 30 %, у ♀ – на 33 %. Через добу відбулося подальше зменшення показника, внаслідок чого відмінність від контролю зросла до 84 % у ♂ та 84 % у ♀. Достовірної різниці між тваринами різної статі на обох етапах розвитку некротичного процесу в серці не спостерігалось.

При розвитку некротичного процесу на тлі L-аргініну вміст NO_2^- в міокарді шлуночків на 1 год досліду знизився на 27 % у ♂ та на 23 % у ♀. На 24 год АПМ даний показник зріс на 32 % у ♂ та на 15 % у ♀ порівняно з вихідним рівнем. При порівняльному аналізі вмісту NO_2^- в міокарді шлуночків ♂ та ♀ за умов АПМ, який розвивався на тлі L-аргініну, встановлено, що інтенсивніше даний показник відновлювався в ♂.

Розвиток АПМ на тлі L-NAME викликав на 1 год спостереження зниження цього показника в міокарді шлуночків тварин обох статей, що у самців становило 66 %, а в самок – 69 %. На 24 год даний показник відновлювався незалежно від статі тварин.

Інтенсивніше на 24 год експерименту відновлення вмісту NO_2^- в міокарді шлуночків, порівняно з міокардом передсердь, можна пояснити підвищеним синтезом оксиду азоту з участю мітохондріальних NO-синтаз, оскільки кількість мітохондрій в кардіоміоцитах шлуночків значно більша, ніж у передсердях [1].

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бурлака А.П. Радикальні форми кисню та оксиду азоту при пухлинному процесі [Текст] / А.П. Бурлака, Є.П. Сидорик. – К. : Наукова думка, 2006. – 228 с.
2. Вплив L-аргініну і блокатора синтази оксиду азоту N-нітро-L-аргініну на вміст катехоламінів у крові щурів за умов стресу / Н.М. Кургалюк, Т.М. Мишутіна, Т.В. Серебровська [та ін.] // Ендокринологія. – 2002. – 7, № 1. – С. 73–76.
3. Караева Е.Н. Новые аспекты действия эстрогенов / Е.Н. Караева // Экспер. и клин. фарм. – 2003. – 66, № 4. – С. 71–78.
4. Караченцев А.Н. Вазоактивные эффекты половых гормонов / А.Н. Караченцев, П.В. Сергеев // Пробл. эндокр. – 1997. – 43, № 2. – С. 45–53.

Аналізуючи вміст NO_2^- в сироватці крові, спостерігали його зниження на 1 год АПМ, що в самців становило 17 %, а в самок – 16 %. На 24 год експерименту вміст NO_2^- у тварин обох статей не відрізнявся від такого в контролі.

При розвитку некротичного процесу на тлі L-аргініну концентрація NO_2^- знизилась на 18 % у ♂ та на 19 % у ♀. Через 24 год спостерігалися збільшення даного показника, відносно контролю даної групи тварин, лише в ♂, що становило 9 %, та відновлення вмісту NO_2^- в сироватці самок.

Моделювання АПМ на тлі L-NAME сприяло незначному збільшенню концентрації NO_2^- в сироватці крові, що на 1 год становило 17 % у тварин обох статей. На 24 год експерименту вміст даного метаболіту в сироватці крові тварин обох статей дещо зменшився і не відрізнявся від такого в контролі. Достовірної різниці між самцями і самками за цим показником не було.

ВИСНОВОК. Пошкодження міокарда адреналіном на тлі L-аргініну чи L-NAME супроводжується зменшенням вмісту нітрит-аніона. Чутливішими до ефектів модуляторів активності системи оксиду азоту є самці. Інтенсивність встановлених змін суттєвіша в міокарді шлуночків.

ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШИХ ДОСЛІДЖЕНЬ полягають у вивченні впливу донатора та блокатора активності системи оксиду азоту на холінергічну регуляцію серця тварин залежно від статі.

5. Марков Х.М. L-аргинин – оксид азота в терапії болезней сердца и сосудов / Х.М. Марков // Кардиология. – 2005. – 45, № 6. – С. 87–95.
6. Сагач В.Ф. Роль эндотелию в регуляції кровообігу / В.Ф. Сагач // Фізіол. журн. 1998. – 44, № 3. – С. 115–116.
7. Соловьев А.И. Фармакология и токсикология оксида азота: два лица одной и той же молекулы / А.И. Соловьев, А.В. Стефанов // Соврем. проблемы токсикологии. – 1998. – № 1. – С. 35–38.
8. Analysis of nitrate, nitrite and (15N) nitrate in biological fluids / C. Green, A.W. David, J. Golawski [et al.] // Anal. Biochem. – 1982. – 126, № 1 – P. 131-138.
9. Crane P.B. Fatigue and physical activity in older women after myocardial infarction / P.B. Crane // Heart Lung. – 2005. – 34, № 1. – P. 30–38.

10. Monkada S. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology / S. Monkada, R.M.J. Palmer, E.A. Higgs // Pharmacol. Rev. – 1991. – 43, № 2. – С. 109–142.

11. Phillips G.B. Relationships in men of sex hormones, insulin, adiposity, and risk factors for myocardial infarction / G.B. Phillips, T. Jing, S.B. Heymsfield // Metabolism. – 2003. – 52, № 6. – P. 784–790.

М.Р. Хара, Е.Е. Юриив, О.В. Кузив

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО

ВЛИЯНИЕ МОДУЛЯТОРОВ АКТИВНОСТИ СИСТЕМЫ ОКСИДА АЗОТА НА СОДЕРЖАНИЕ НИТРИТ-АНИОНА В СЕРДЦЕ КРЫС РАЗНОГО ПОЛА ПРИ АДРЕНАЛИНОВОМ ПОВРЕЖДЕНИИ

Резюме

В опытах на половозрелых самцах и самках крыс изучено влияние донатора (L-аргинин) и блокатора (L-NAME) синтеза оксида азота (NO) на динамику содержания в крови и миокарде стабильного метаболита оксида азота нитрит-аниона (NO_2^-) в условиях повреждения миокарда адреналином (1 мг/кг, внутримышечно, одномоментно). Животных наблюдали на 1 и 24 час после введения адреналина. Установлено, что развитие некротического процесса на фоне L-аргинина и L-NAME вызывает снижение содержания NO_2^- в миокарде предсердий, особенно на 1 час эксперимента. В миокарде желудочков на 1 час эксперимента содержание NO_2^- уменьшалось, а на 24 час происходило его возрастание до исходного уровня. Установленные эффекты обнаруживали при применении как L-аргинина, так и L-NAME. Более интенсивной динамика была при использовании L-NAME, и более чувствительными к эффектам примененных модуляторов оказались самцы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: миокард, пол, некроз, оксид азота, нитрит-анион.

M.R. Khara, K.Ye. Yuriyiv, O.V. Kuziv

YA. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

THE INFLUENCE OF ACTIVITY MODULATORS OF NITRIC OXIDE SYSTEM ON ANION NITRITE CONTENT IN MYOCARDIUM AND BLOOD SERUM OF DIFFERENT SEX RATS AT ADRENALINE DAMAGING.

Summary

The influence of donator (L-arginine) and blocker (L-NAME) of nitric oxide synthesis on dynamic of content of stable metabolite of nitric oxide anion nitrite (NO_2^-) in blood and myocardium at myocardial adrenaline damaging (1 mg/kg, intramuscularly) at experiments on male and female rats has been researched. Animals have been observed on the 1 and 24 hours after injection of adrenaline. It has been established that the development of necrotic process by the influence of L-arginine and L-NAME cause a decreasing of NO_2^- in the atriums myocardium, especially on the 1 hour of experiment. The content of NO_2^- in ventricular myocardium on the 1 hour has decreased and on the 24 hour has increased to the basic level. The established effects have been identified at the influence of as L-arginine as L-NAME. The dynamics by the influence of L-NAME has been more intensive. The males have been more sensitive to the effects of the applied modulators.

KEY WORDS: myocardium, sex, necrosis, nitric oxide, nitrite anion.

Отримано 18.11.10

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

КОРИГУВАЛЬНИЙ ВПЛИВ АЛЬФА-ТОКОФЕРОЛУ НА СТАН АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ НЕЙТРОФІЛЬНИХ ГРАНУЛОЦИТІВ ЩУРІВ, ІНТОКСИКОВАНИХ КАТІОНАМИ КАДМІЮ

Досліджували вплив вітаміну Е (α-токоферолу) на стан антиоксидантної системи в нейтрофільних гранулоцитах білих щурів, інтоксикованих шляхом введення CdCl₂. Установлено, що під впливом катіонів кадмію активність ферментів-антиоксидантів у клітинах піддослідних тварин змінюється по-різному, а саме: супероксиддисмутаза і глутатіонпероксидаза – зростає, а каталаза – знижується. У нейтрофільних гранулоцитах щурів, яким вводили α-токоферол водночас із хлоридом кадмію, спостерігається нормалізація активності супероксиддисмутази і каталази, а глутатіонпероксидазна активність зменшується порівняно зі значеннями, притаманними клітинам тварин, яким вводили лише хлорид кадмію. Отримані дані свідчать про те, що під впливом α-токоферолу зменшується ступінь оксидативного стресу, зумовленого дією катіонів важкого металу.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: кадмій, α-токоферол, нейтрофільні гранулоцити, антиоксидантна система.

ВСТУП. Кадмій – це високотоксичний важкий метал, який має здатність до акумуляції в організмі, у зв'язку з чим становить особливу небезпеку для здоров'я людей і тварин [14]. У механізмах токсичної дії даного елемента істотну роль відіграє інтенсифікація процесів вільнорадикального окиснення, які викликають деструктивні зміни на клітинному рівні. Це призводить до розвитку патологічних змін у функціонуванні ряду життєво важливих органів та систем організму [2, 11, 17]. З результатів токсикологічних та епідеміологічних досліджень відомо, що тривале надходження до організму сполук кадмію навіть у малих дозах зумовлює характерні зміни метаболізму в клітинах імунної системи [1, 15]. Оскільки нейтрофільні гранулоцити відіграють важливу роль у розвитку імунної відповіді та взаємодіють під час цього процесу з лімфоцитами й іншими клітинами [13], для організму важливо зберігати дані клітини функціонально активними, зменшуючи вплив на них продуктів вільнорадикального окиснення. Тому дослідження і розробка ефективних засобів корекції метаболічних порушень, зумовлених катіонами кадмію, в нейтрофільних гранулоцитах є актуальним завданням біологічної та медичної наук.

© Л.П. Білецька, Г.Л. Антоняк, 2010.

Відомо, що одним з найефективніших перехоплювачів активних форм кисню (АФО) в ліпідній фазі клітин є вітамін Е (токоферол), який застосовують як протектор патологічних станів, пов'язаних з активацією процесів вільнорадикального окиснення [7, 8]. Метою нашої роботи було дослідити вплив α-токоферолу на стан антиоксидантної системи у нейтрофільних гранулоцитах тварин, яким вводили CdCl₂, і з'ясувати доцільність застосування даного антиоксиданта для корекції та профілактики метаболічних змін у цих клітинах, зумовлених катіонами кадмію.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проводили на безпородних білих лабораторних щурах-самцях масою 160-180 г, яких утримували за умов віварію. У процесі експерименту було сформовано три групи тварин: дві дослідні (Д1, Д2) та контрольну (К), по 5 особин у кожній. Щурам групи Д1 щодоби вводили в шлунок розчин хлориду кадмію (3 мг/кг маси) впродовж семи діб. Тваринам групи Д2 вводили CdCl₂ в зазначеній вище дозі, однак, починаючи з 5-ї доби експерименту, тварини внутрішньошлунково отримували препарат α-токоферолу (100 мг/кг) упродовж трьох діб. Щурам контрольної групи вводили в шлунок фізіологічний розчин за такою ж схемою. Ма-

теріалом досліджень була кров тварин контрольної та дослідних груп, яку отримували через 24 год після закінчення експерименту. Всі дослідні процедури здійснювали відповідно до правил поведінки з експериментальними тваринами.

Нейтрофільні гранулоцити крові отримували, користуючись стандартною методикою фракціонування клітин із застосуванням градієнта густини сумішей фіколу та верографіну [6]. Цілісність і життєздатність клітин перевіряли цитологічно, за допомогою реакції з трипановим синім.

Лізис лейкоцитів здійснювали шляхом трикратного заморожування і розморожування водних суспензій клітин з наступним центрифугуванням при 10 000 г. У лізатах клітин досліджували активність ферментів антиоксидантної системи (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіонпероксидаза). Супероксиддисмутазну активність визначали за рівнем гальмування ферментом процесу відновлення нітросинього тетразолію за присутності NADH і феназинметасульфату [3]. Каталазну активність досліджували за допомогою стандартної методики, використовуючи гідроген пероксид як субстрат реакції [5], глутатіонпероксидазну – за швидкістю окиснення глутатіону за

присутності гідропероксиду третинного бутілу [4]. Вміст білка в лізатах визначали за загальновідомим методом Лоурі й співавторів (1951). Отримані результати опрацьовували статистично з використанням методів варіаційної статистики.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. З результатів досліджень видно, що активність супероксиддисмутази змінюється неоднозначно в дослідних групах тварин. Так, у щурів групи Д1, яким вводили лише CdCl_2 , спостерігається підвищення активності ферменту в 1,6 раза ($p < 0,05$) відносно контрольних значень (рис. 1). Імовірно, активація супероксиддисмутази є однією з адаптаційних реакцій досліджуваних клітин на прооксидантний вплив катіонів кадмію. Таке явище спостерігається і в інших клітинах тварин за умов тривалого надходження до організму сполук важких металів [16]. Щодо супероксиддисмутазної активності в нейтрофільних гранулоцитах щурів групи Д2 (вводили CdCl_2 і α -токоферол), то цей показник знижується до значень, притаманних клітинам тварин контрольної групи. Це може свідчити про активне включення α -токоферолу в процес видалення АФО і, як наслідок, зменшення рівня утворення супероксид-аніон радикалів.

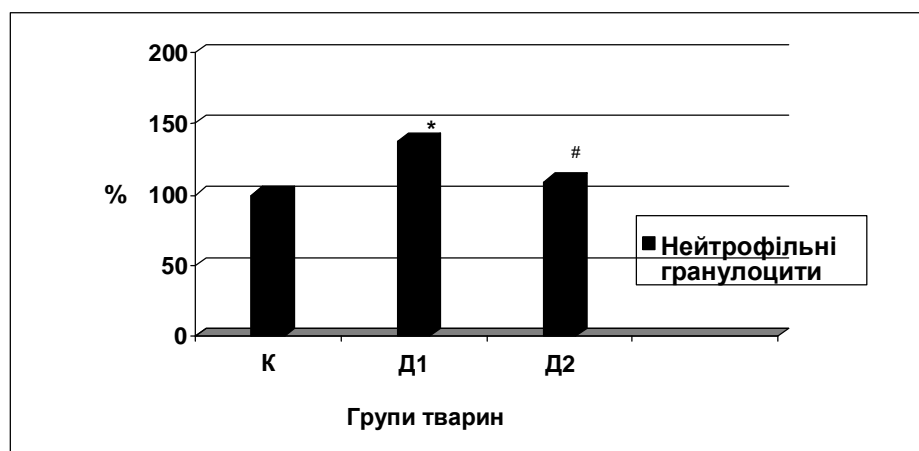


Рис. 1. Супероксиддисмутазна активність у нейтрофільних гранулоцитах щурів, яким вводили CdCl_2 (група Д1) та CdCl_2 і α -токоферол (група Д2).

Примітка. На цьому та інших рисунках: * – вірогідність відмінностей між контрольною і дослідними групами тварин; # – вірогідність відмінностей між дослідними групами Д1 і Д2 (* – $p < 0,05$, *** – $p < 0,001$, # – $p < 0,05$, ## – $p < 0,01$).

Як відомо, продуктом супероксиддисмутазної реакції є гідроген пероксид, який відтак метаболізується з участю ферментів глутатіонпероксидази і каталази. Результати досліджень свідчать про те, що глутатіонпероксидазна активність у нейтрофільних гранулоцитах щурів групи Д1 збільшується втричі порівняно з контролем ($p < 0,001$), а в клітинах тварин

групи Д2 – значно зменшується порівняно з групою Д1 (рис. 2). Відмічене зниження активності глутатіонпероксидази в клітинах щурів, яким вводили вітамін Е, порівняно зі значенням, притаманним групі тварин, інтоксикованих хлоридом кадмію, підтверджує активну роль α -токоферолу в механізмах захисту клітин від дії вільних радикалів.

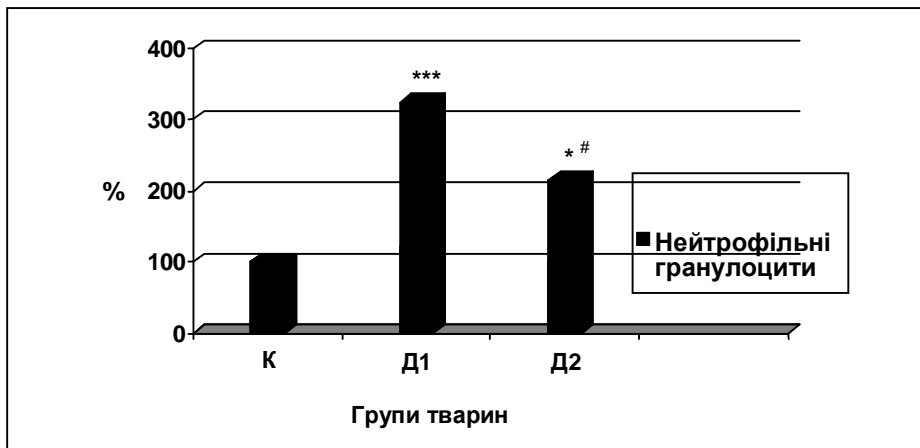


Рис. 2. Глутатіонпероксидазна активність у нейтрофільних гранулоцитах щурів, яким вводили CdCl_2 (група Д1) та CdCl_2 і α -токоферол (група Д2).

У процесі досліджень встановлено, що каталазна активність у нейтрофільних гранулоцитах щурів, інтоксикованих катіонами кадмію (група Д1), знижується відносно контрольної групи. У клітинах тварин групи Д2 значення цього показника нормалізується (рис. 3).

Аналізуючи отримані результати, необхідно враховувати відомі з джерел наукової літератури дані про те, що клітини імунної системи чутливі до дії α -токоферолу [7, 12]. Результати досліджень свідчать про те, що введення тва-

ринам α -токоферолу водночас із хлоридом кадмію істотно зменшує в нейтрофільних гранулоцитах прояви оксидативного стресу, зумовленого дією важкого металу. За умов застосування вітаміну Е в клітинах інтоксикованих кадмієм тварин нормалізується активність ферментів антиоксидантної системи супероксиддисмутази і каталази, а глутатіонпероксидазна активність зменшується порівняно з лейкоцитами щурів, отруєних шляхом тривалого введення CdCl_2 .

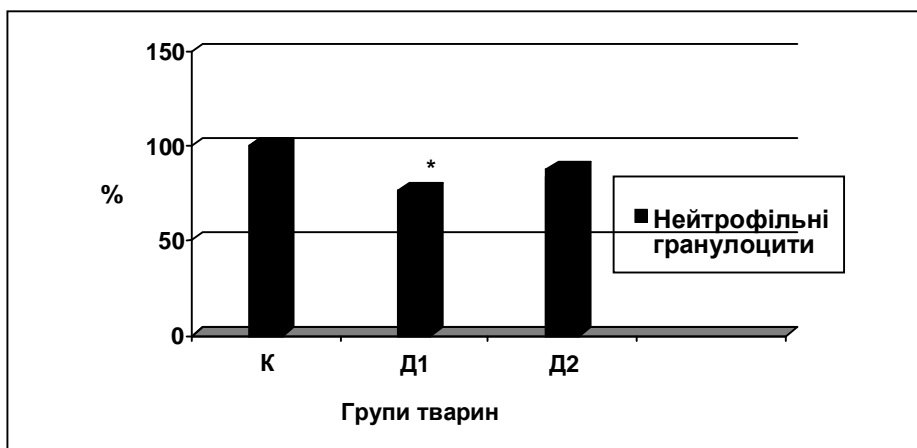


Рис. 3. Каталазна активність у нейтрофільних гранулоцитах щурів, яким вводили CdCl_2 (група Д1) та CdCl_2 і α -токоферол (група Д2).

Загалом отримані результати свідчать про коригувальний вплив α -токоферолу на стан антиоксидантної системи у нейтрофільних гранулоцитах тварин за умов токсичного впливу на них катіонів кадмію.

ВИСНОВКИ. Вітамін Е (α -токоферол) нормалізує активність ферментів антиоксидантної

системи супероксиддисмутази і каталази та зменшує рівень активації глутатіонпероксидази в нейтрофільних гранулоцитах щурів, інтоксикованих хлоридом кадмію. Установлені ефекти свідчать про коригувальний вплив α -токоферолу на антиоксидантний статус лейкоцитів тварин за умов його порушення під впливом катіонів кадмію.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Антоняк Г.Л., Білецька Л.П. Активність ферментів-антиоксидантів у лейкоцитах білих щурів за умов тривалого введення хлориду кадмію // Біологія тварин. – 2008. – **10**, № 1-2. – С. 216-220.
2. Гонський Я.І., Куліцька М.І. Зміни антиоксидантної системи у щурів за умов комбінованого токсичного ураження хлоридом свинцю та нітритом натрію // Мед. хімія. – 2009. – **11**, № 1. – С. 80-83.
3. Дубинина Е.Е., Сальникова Л.А., Ефимова Л.Ф. Активність и изоферментный спектр супероксиддисмутазы эритроцитов и плазмы крови человека // Лаб. дело. – 1983. – № 10. – С. 30-33.
4. Моин В.М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах // Лаб. дело. – 1986. – № 12. – С. 724-727.
5. Beers R.F., Sizer I.W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of H₂O₂ by catalase // J. Biol. Chem. – 1952. – **195**, № 1. – P. 133-140.
6. Boyum A.A. A one-stage procedure for isolation of granulocytes and lymphocytes from human blood // Scand. J. Clin. Lab. Invest. – 1968. – **21**, Suppl. 97. – P. 51-76.
7. Clarke M.W., Burnett J.R., Croft K.D. Vitamin E in human health and disease // Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. – 2008. – **45**, № 5. – P. 417-450.
8. El-Benna J., Dang P.M., Gougerot-Pocidalo M.A., Elbim C. Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses // Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz). – 2005. – **53**, № 3. – P. 199-206.
9. Jurczuk M., Brzyska M.M., Moniuszko-Jakoniuk J. et al. Antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to cadmium and ethanol // Food Chem. Toxicol. – 2004. – **42**, № 3. – P. 429-438.
10. Kozat S., Gunduz H., Deper Y. et al. Studies on serum β -tocopherol, selenium levels and catalase activities in lambs with white muscle disease // Bull. Vet. Inst. Pulawy. – 2007. – **51**. – P. 281-284.
11. Liu J., Qu W., Kadiiska M.B. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 2009. – **238**, № 3. – P. 209-214.
12. Mustacich D.J., Bruno R.S., Traber M.G. Vitamin E // Vitam. Horm. – 2007. – **76**. – P. 1-21.
13. Omori K., Ohira T., Uchida Y. Priming of neutrophil oxidative burst in diabetes requires preassembly of the NADPH oxidase // J. Leukoc. Biol. – 2008. – **84**. – P. 17-22.
14. Satarug S., Baker J.R., Urbenjapol S. et al. A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population // Toxicol. Lett. – 2003. – **137**. – P. 65-83.
15. Satarug S., Moore M.R. Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium in foodstuffs and cigarette smoke // Environ. Health Perspect. – 2004. – **112**, № 10. – P. 1099-10103.
16. Storz G., Tartaglia L.A., Ames B.N. Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation // Science. – 1990. – **248**, № 4952. – P. 189-194.
17. Valko M., Morris H., Cronin M.T. Metals, toxicity and oxidative stress // Curr. Med. Chem. – 2005. – **12**, № 10. – P. 1161-1208.

Л.П. Білецька, Г.Л. Антоняк
ЛЬВОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ ДАНИЛА ГАЛИЦКОГО
ЛЬВОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ ИВАНА ФРАНКО

КОРРИГУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ АЛЬФА-ТОКОФЕРОЛА НА СОСТОЯНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ КРЫС, ОТРАВЛЕННЫХ КАТИОНАМИ КАДМИЯ

Резюме

Исследовали влияние витамина E (α -токоферола) на состояние антиоксидантной системы в нейтрофильных гранулоцитах белых крыс, отравленных путём введения CdCl₂. Установлено, что под влиянием катионов кадмия активность ферментов-антиоксидантов в клетках подопытных животных изменяется по-разному, а именно: супероксиддисмутазная и глутатионпероксидазная – возрастает, а каталазная – снижается. В нейтрофильных гранулоцитах крыс, которым вводили α -токоферол одновременно с хлоридом кадмия, наблюдается нормализация активности супероксиддисмутазы и каталазы, а глутатионпероксидазная активность уменьшается по сравнению со значениями, присущими клеткам животных, которым вводили только хлорид кадмия. Полученные данные свидетельствуют о том, что под влиянием α -токоферола уменьшается степень оксидативного стресса, обусловленного действием катионов тяжелого металла.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: кадмий, α -токоферол, нейтрофильные гранулоциты, антиоксидантная система.

CORRECTIVE EFFECTS OF ALPHA-TOCOPHEROL ON ANTIOXIDANT SYSTEM IN NEUTROPHILIC GRANULOCYTES OF RATS, POISONED WITH CADMIUM CATIONS

Summary

The effects of vitamin E (α-tocopherol) on antioxidant status of neutrophilic granulocytes in rats, poisoned with CdCl₂ were studied. It was established, that under the influence of cadmium cations the activities of antioxidant enzymes in the cells of experimental animals changed in different ways, namely: superoxide dismutase and glutathione peroxidase increased, and catalase – decreased. Injection of α-tocopherol simultaneously with cadmium chloride led to normalization of activities of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase) in neutrophilic granulocytes. Under the influence of α-tocopherol glutathione peroxidase activity of neutrophils decreased as compared with the values in animals that were injected with cadmium chloride only. These data suggest that the impact of α-tocopherol reduce the degree of oxidative stress caused by the action of heavy metal cations.

KEY WORDS: **cadmium, α-tocopherol, neutrophils, antioxidant system.**

Отримано 21.09.10

Адреса для листування: Л.П. Білецька, Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, вул. Пекарська, 69, Львів, 79010, Україна.

ПОРУШЕННЯ ЛІПІДНОГО, ВУГЛЕВОДНОГО ТА ПУРИНОВОГО ОБМІНУ У ХВОРИХ НА АРТЕРІАЛЬНУ ГІПЕРТЕНЗІЮ

Проаналізовано стан вуглеводного, ліпідного та пуринового обміну у хворих на артеріальну гіпертензію. Встановлено, що рівень глюкози та ліпідів крові в даній категорії хворих перевищує такий у пацієнтів контрольної групи. Наявність надлишкової маси тіла обтяжує перебіг захворювання та супроводжується порушеннями обміну глюкози, ліпідів та пуринів. Отримані дані рекомендовано враховувати при оцінці клінічного стану хворих та проведенні гіпотензивної терапії.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: ліпідний обмін, вуглеводний обмін, пуриновий обмін, артеріальна гіпертензія.

ВСТУП. Артеріальна гіпертензія (АГ) є одним з найбільш поширених хронічних захворювань людини. У більшості країн світу підвищення артеріального тиску (АТ) реєструють у 20-30 % дорослого населення, воно суттєво впливає на тривалість і якість життя.

Артеріальна гіпертензія – один з основних факторів ризику серцево-судинних захворювань: ішемічної хвороби серця (ІХС), серцевої недостатності, інсульту. В більшості випадків АГ поєднується з іншими факторами ризику (порушенням ліпідного, вуглеводного та пуринового обміну). Однак патогенез гіпертонічної хвороби (ГХ) не обмежується підвищенням артеріального тиску. Гіпертензія є не сутністю, а лише одним із проявів гіпертонічної хвороби. У ряді робіт було доведено, що ефективний контроль АТ в осіб з АГ попереджує розвиток інсульту, проте практично не відображається на ризику розвитку ІХС [6]. Це положення підтверджується результатами популяційного дослідження [7], що означає існування при ГХ порушень проатерогенного характеру, не пов'язаних із підвищенням АТ. Результати досліджень останніх років свідчать про те, що ризик розвитку ІХС в осіб з гіпертензією більшою мірою корелює з порушеннями метаболізму, ніж з рівнем АТ.

У більшості випадків АГ розвивається як компонент метаболічного синдрому [11], поєднується з інсулінорезистентністю та дисліпі-

демією. Спроби нормалізації АТ без врахування супутніх метаболічних порушень можуть не справляти суттєвого впливу на проатерогенний потенціал крові, ризик розвитку атеросклерозу та ІХС. Доведено, що розвиток інсулінорезистентності етіологічно пов'язаний з ГХ [10].

Існують дані щодо тісного взаємозв'язку дисліпідемії та інсулінорезистентності, які є основними компонентами метаболічного синдрому. За умов гіперінсулінемії та зниження чутливості до інсуліну в жировій тканині, особливо вісцеральній, відбуваються посилені ліполіз і збільшення доставки вільних жирних кислот у печінку, що призводить до збільшення продукції холестерину ліпопротеїдів низької щільності, гіпертригліцеридемії та зниження вмісту ліпопротеїдів високої щільності. Часте поєднання АГ і дисліпідемії пояснюють безпосереднім впливом гіперхолестеринемії та дисліпопротеїдемії на тонус периферичних судин [9]. Існують вагомі докази ролі ліпопротеїдів низької та дуже низької щільності в розвитку ендотеліальної дисфункції. Окиснюючись, ліпопротеїди низької щільності беруть участь в утворенні пінистих клітин, які формують, поряд із ліпідними включеннями, ядро атеросклеротичної бляшки. При цьому вивільнюється багато активних субстанцій (туморнекротичний фактор, інтерлейкіни), які беруть участь у процесах міграції та проліферації гладком'язових клітин судини, посиленні синтезу та розпаду колагену. За умов ліпідного навантаження дані процеси набувають пато-

© Л.А. Ільницька, О.В. Кректун, 2010.

логічного характеру, сприяють дисфункції ендотелію, порушенню синтезу оксиду азоту, збільшенню продукції ендотеліну-1 та вазоконстрикції.

В останні роки акцентується увага на взаємозв'язках АГ і метаболічного синдрому з порушенням обміну пуринів – подагрою та безсимптомною гіперурикемією [2-4]. Дані літератури свідчать про асоціацію подагри з метаболічним синдромом та його компонентами. Частота подагри і гіперурикемії вища серед хворих на АГ та ІХС, хронічну серцеву недостатність [1]. Тому в останні роки гіперурикемію розглядають як незалежний фактор ризику серцево-судинних захворювань і смертності у загальній популяції [1, 4, 8].

Метою даної роботи було проаналізувати рівень інсуліну та глюкози, ліпідного спектра крові, рівень сечової кислоти у хворих на артеріальну гіпертензію I і II стадій та в осіб контрольної групи з нормальним рівнем АТ.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Було обстежено 112 хворих на артеріальну гіпертензію I і II стадій (I група) та 40 осіб контрольної групи (II група). Середній вік обстежуваних становив $(51,3 \pm 2,8)$ року. В I групі обстежуваних було 60 чоловіків (53,6 %) та 52 жінки (46,4 %), у II – 22 чоловіки (55 %) та 18 жінок (45 %). Серед осіб I групи артеріальну гіпертензію I стадії діагностовано у 58 хворих (51,8 %), II стадії – у 54 хворих (48,2 %). Для оцінки взаємозв'язків між метаболічними порушеннями та масою тіла пацієнтів обох груп було поділено на підгрупи залежно від значення індексу маси тіла (ІМТ): Ia (n=38) та IIa (n=17) – з нормальною масою тіла ($IMT < 25 \text{ кг/м}^2$); Ib (n=74) та IIb (n=23) – з надлишковою масою тіла ($IMT > 25 \text{ кг/м}^2$).

Критеріями виключення були симптоматична артеріальна гіпертензія, ІХС, хронічна серцева недостатність високих градацій, цукровий діабет.

У всіх обстежуваних вимірювали АТ та визначали такі показники: рівень глюкози та інсуліну натщесерце; через 1 і 2 год після прийняття 60 г глюкози; рівень загального холестерину (ХС), ліпопротеїдів низької (ЛПНЩ) та високої щільності (ЛПВЩ), тригліцеридів (ТГ); рівень сечової кислоти (СК).

Інсулінорезистентність виявляли за допомогою індексу НОМА, який розраховували за формулою: $НОМА = \text{глюкоза натщесерце} \times \text{інсулін натщесерце} / 22,5$. Інсулінорезистентність діагностували при рівні індексу НОМА, вищому 3. Вміст глюкози, ХС, ЛПНЩ, ЛПВЩ, ТГ, СК у крові визначали на біохімічному аналізаторі “Cobas

Integra 400+”, виробник “Roche”, з використанням реактивів фірми “Roche”. За нормальні значення брали: рівень глюкози – $3,59\text{-}5,83 \text{ ммоль/л}$, холестерину – $3,0\text{-}6,2 \text{ ммоль/л}$, тригліцеридів – $0,45\text{-}1,82 \text{ ммоль/л}$, ХС ЛПНЩ – $2,74\text{-}3,08 \text{ ммоль/л}$, ХС ЛПВЩ – $0,78\text{-}2,2 \text{ ммоль/л}$, сечової кислоти – $200\text{-}416 \text{ мкмоль/л}$.

Рівень інсуліну визначали шляхом твердофазного хемілюмінесцентного імуноферментного аналізу на хемілюмінесцентному аналізаторі “Immulite-1000”, виробництва DPC (США), з використанням тест-систем DPC – Siemens. За нормальний рівень інсуліну брали значення: $6\text{-}27 \text{ мкМО/мл}$.

Статистичну обробку даних проводили із застосуванням пакета статистичних програм Microsoft Office Excel 2003.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. У результаті дослідження встановлено, що рівень інсуліну натщесерце відрізнявся у групі хворих на артеріальну гіпертензію ($(18,2 \pm 1,3) \text{ мкМО/мл}$) та контрольній групі ($(7,9 \pm 1,1) \text{ мкМО/мл}$) ($p < 0,001$). Через 1 год після навантаження глюкозою рівень інсуліну складав $(63,2 \pm 3,7)$ та $(34,8 \pm 3,9) \text{ мкМО/мл}$ відповідно в I і II групах ($p < 0,001$). Через 2 год після приймання глюкози показники становили $(35,6 \pm 2,6)$ та $(17,1 \pm 2,2) \text{ мкМО/мл}$ відповідно ($p < 0,001$). Рівень глюкози натщесерце був вищим у I групі хворих і складав $(5,92 \pm 0,25)$ та $(4,87 \pm 0,21) \text{ ммоль/л}$ відповідно. Через 1 год після навантаження глюкозою показники глюкози крові становили $(10,1 \pm 0,18)$ та $(7,2 \pm 0,09) \text{ ммоль/л}$ відповідно ($p < 0,001$). Через 2 год різниця вмісту глюкози в обох групах зникла, реєстрували такі її значення: $(5,71 \pm 0,13)$ ммоль/л у хворих на артеріальну гіпертензію та $(5,37 \pm 0,08) \text{ ммоль/л}$ у контрольній групі. Індекс НОМА, розрахований у пацієнтів I групи, становив $3,3 \pm 0,4$, тоді як у контрольній групі – $1,8 \pm 0,2$ ($p < 0,01$). Дослідження показало, що рівні інсуліну натщесерце та індексу НОМА були достовірно вищими у підгрупі хворих на артеріальну гіпертензію з ІМТ, більшим 25 кг/м^2 , порівняно з хворими, які мали нормальну масу тіла, і становили: інсулін – $(19,2 \pm 1,2)$ та $(11,7 \pm 1,8) \text{ мкМО/мл}$ ($p < 0,001$); індекс НОМА – $(3,5 \pm 0,3)$ та $(2,7 \pm 0,1)$ ($p < 0,001$) відповідно.

У дослідженні не було встановлено чіткого взаємозв'язку між підвищеними значеннями артеріального тиску і рівнем сечової кислоти. Однак у підгрупі Ib зареєстровано достовірно більші її значення порівняно з пацієнтами підгрупи Ia – $(487,5 \pm 7,8)$ та $(392 \pm 11,2) \text{ мкмоль/л}$ відповідно. При аналізі

показників ліпідного обміну встановлено, що рівень загального ХС, ЛПНЩ, ТГ був вищим у хворих на АГ порівняно з контрольною групою. При порівнюванні підгруп Іа і Іб виявлено, що у підгрупі з надмірною масою тіла реєструються вищі значення загального ХС і ТГ, а відмінності між результатами ЛПНЩ і ЛПВЩ є достовірними: у підгрупі Іа – (3,1±0,1) та (1,12±0,05) ммоль/л відповідно, у підгрупі Іб – (3,8±0,09) та (0,68±0,04) ммоль/л відповідно.

ВИСНОВКИ. 1. У хворих на артеріальну гіпертензію І та ІІ стадій відмічають гіперінсулінемію натщесерце та підвищення індексу

НОМА. Рівень глюкози, ліпідів крові у даній категорії хворих перевищує такий у пацієнтів контрольної групи.

2. Наявність надлишкової маси тіла у пацієнтів з артеріальною гіпертензією взаємопов'язана з порушенням обміну вуглеводів, ліпідів та гіперурикемією.

3. Оцінка клінічного стану хворих на артеріальну гіпертензію та проведення гіпотензивної терапії повинні базуватись не тільки на досягненні цільового рівня артеріального тиску, але й на врахуванні метаболічного статусу пацієнта.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бильченко А.В. Гиперурикемия как фактор риска сердечно-сосудистой заболеваемости и смертности // Здоров'я України. – 2009. – Тематичний номер, червень. – С. 46-48.

2. Коваленко В.М., Шуба Н.М. Номенклатура, класифікація, критерії діагностики і програми лічення ревматических болезней. – К., 2004. – С. 156.

3. Коваленко В.Н., Насукай Е.Г., Яковенко А.Ю. Проблемы диагностики и ведения больных с метаболическим синдромом // Укр. кардиол. журн. – 2006. – № 4. – С. 98-105.

4. Паньків В.І., Зуєв К.О. Гіперурикемія у хворих із високим серцево-судинним ризиком і шляхи її корекції // Здоров'я України. Медична газета. – 2007. – № 10/1. – С. 66-67.

5. Свищенко Е.П., Коваленко В.Н. Гипертоническая болезнь. Вторичные гипертензии. – К.: Либідь, 2002. – 502 с.

6. Талаєва Т.В., Ларіонов О.П., Крячок та ін. Характер та механізми порушень обміну ліпопротеїдів при відтворенні системного запалення в умовах експерименту // Укр. кардиол. журн. – 2006. – № 4. – С. 63-70.

7. Cheung V.M., Wat N.M., Man Y.V. Relationship between the metabolic syndrome and the development

of hypertension in the Hong Kong Cardiovascular Risk Factor Prevalence Study-2 (CRISPS2) // Amer. J. Hypertens. – 2008. – **21**, № 1. – P. 17-22.

8. France L.V., Pahon M., di Bari M. et al. Serum uric acid, diuretic treatment and risk of cardiovascular events in the Systolic Hypertension in the Elderly Program (AHERP) // J. Hypertension. – 2000. – **18**. – P. 1149-1154.

9. Grundy S., Cleeman J., Merzco N. et al. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment // Panel III Guidelines. Circulation. – 2004. – **110**. – P. 227-239.

10. Ishizaka N., Ishizaka Y., Toda E. Association between serum uric acid, metabolic syndrome, and carotid atherosclerosis in Japanese individuals // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2005. – **25**, № 5. – P. 1038-1044.

11. Ishizaka N., Ishizaka Y., Toda E. Hypertension is the most common component of metabolic syndrome and the greatest contributor to carotid arteriosclerosis in apparently healthy Japanese individuals // Hypertens. Res. – 2005. – **28**, № 1. – P. 27-34.

12. Reaven G.M. Insulin resistance, cardiovascular disease, and the metabolic syndrome // Diabetes Care. – 2004. – **27**. – P. 1011-1012.

Л.А. Ильницкая, О.В. Крестун

*РОВЕНСКИЙ ОБЛАСТНОЙ КЛИНИЧЕСКИЙ ЛЕЧЕБНО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР ИМЕНИ В. ПОЛИЩУКА
ЛЬВОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ДАНИЛА ГАЛИЦКОГО*

НАРУШЕНИЯ ЛИПИДНОГО, УГЛЕВОДНОГО И ПУРИНОВОГО ОБМЕНА У БОЛЬНЫХ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ

Резюме

Проанализировано состояние углеводного, липидного и пуринового обмена у больных артериальной гипертензией. Установлено, что уровень глюкозы и липидов крови в этой категории больных превышает

такой у пациентов контрольной группы. Наличие излишней массы тела отягощает течение заболевания и сопровождается нарушениями обмена глюкозы, липидов и пуринов. Полученные данные рекомендуется учитывать при оценке клинического состояния больных и проведении гипотензивной терапии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: липидный обмен, углеводный обмен, пуриновый обмен, артериальная гипертензия.

L.A. Ilnytska, O.V. Krektun

V. POLISHCHUK RIVNE REGIONAL CLINICAL REMEDIAL AND DIAGNOSTIC CENTRE
DANYLO HALYTSKYI LVIV NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY

DISORDER OF LIPID, CARBOHYDRATE AND PURINE METABOLISM IN PATIENTS WITH ARTERIAL HYPERTENSION

Summary

The analysis of carbohydrate, lipid and purine metabolism has been conducted in patients with arterial hypertension. It has been shown higher blood levels of glucose and lipids in these patients compared to the control group. Excessive body weight aggravates the condition and is associated with glucose, lipid and purine metabolism disorders. The findings are recommended for consideration when evaluating patients' clinical condition and administering hypotensive therapy.

KEY WORDS: lipid metabolism, carbohydrate metabolism, purine metabolism, arterial hypertension.

Отримано 03.11.10

Адреса для листування: Л.А. Ільницька, Рівненський обласний клінічний лікувально-діагностичний центр імені В. Поліщука, вул. 16 Липня, 36, Рівне, 38000, Україна.

М.І. Швед, Н.В. Пасечко, Л.В. Наумова, А.О. Боб, О.І. Зарудна. І.В. Голик
ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО

ПОКАЗНИКИ ГЛІКОВАНОГО ГЕМОГЛОБІНУ У ХВОРИХ НА ЦУКРОВИЙ ДІАБЕТ У ТЕРНОПІЛЬСЬКІЙ ОБЛАСТІ

У статті оцінено рівень глікованого гемоглобіну у хворих на цукровий діабет 1 і 2 типів у Тернопільській області. Показано, що середній рівень глікованого гемоглобіну по Тернопільській області склав 10,2 %. Компенсованими виявилися 4,65 % пацієнтів, субкомпенсованими – 15,11 %, некомпенсованими – 80,83 %. Найкращий рівень компенсації показали хворі, які отримували аналоги людських інсулінів. Серед областей найбільш компенсованими були пацієнти з Бережанського району.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: цукровий діабет, глікований гемоглобін.

ВСТУП. Згідно з рекомендаціями Міжнародної діабетичної федерації, оприлюдненими у 2007 р., ступінь компенсації цукрового діабету у хворих на цукровий діабет 1 типу залежить від цільових параметрів глікемічного контролю.

На даний час основним показником оцінки глікемічного стану хворих на цукровий діабет є показник рівня глікованого гемоглобіну [1, 2].

Неензиматичне глікозування (глікування) білка – це біохімічна реакція, яка полягає в приєднанні моносахариду до протеїну з подальшим перетворенням сполуки, що утворилася, на стабільну кетоамінову сполуку і перебігає без участі ферментів; так звана реакція альдольної конденсації. Така реакція вперше була досліджена й описана L. Maillard (Л. Мейлардом) у 1913 р.

Більшість протеїнів, що синтезуються в організмі людини, піддаються глікуванню. Процес глікування білка можна поділити на ферментативний та неферментативний. Перший (ферментативний) перебігає в ендоплазматичній сітці клітини з участю ферментів (глікозилтрансфераз). Глікозилтрансферази каталізують нарощування олігосахаридного ланцюга в молекулі білка з утворенням повноцінного глікопротеїну. Другий (неферментативний) є реакцією хімічного з'єднання білка з моносахаридом (реакцією альдольної конденсації) з подальшим можливим перетворенням створеної сполуки. Неферментативне глікозування (глікування) відбувається при нормальному функціонуванні білка й контакті його з аль-

дегідною формою глюкози або іншим редукованим моносахаридом. Реакція хімічної конденсації є реакцією з'єднання аміну (NH_2 -групи) та альдегіду (CHO -групи) (зворотна реакція Шиффа). Альдегід приєднується, як правило, до вільної NH_2 -групи кінцевої амінокислоти, наприклад до валіну в гемоглобіні HbA (HbA1c), або до однієї з доступних е-аміногруп залишку лізину (переважно білків). Якщо відбувається з'єднання лізину і глюкози, то в ході реакції Мейларда утворюється перший продукт глікування білка, який формується протягом декількох годин у неферментозумовленій реакції між аміногрупами протеїнів та карбонільними групами в реакції скріплення вуглеводів, особливо глюкози й фруктози, які приєднуються до бічних ланцюгів лізину або до N-терміналу білка. Така неферментозалежна реакція перебігає тільки з ациклічною формою глюкози, концентрація якої не перевищує 0,002 % від концентрації циклічної форми цього вуглеводу в біологічній системі [5-7].

Гемоглобін людини – це складний протеїн, що складається з чотирьох субодиниць, які утворюють четвертинну структуру.

Неензиматично глікований (глікований) гемоглобін – це гемоглобін, в якому молекула глюкози конденсується з b-кінцевим валіном у b-ланцюзі молекули гемоглобіну. Неферментозумовлене глікозування гемоглобіну викликає зміну його біохімічних властивостей, що, у свою чергу, призводить до багатьох метаболических порушень у біологічному об'єкті. Глікований гемоглобін має завищену спорідненість до кисню, що спричиняє тканинну гіпоксію та зниження здатності еритроцитів до

деформації і підвищення їх в'язкості. Такі нефізіологічні структурно-метаболичні перетворення призводять до різноманітних клінічних та органофункціональних проявів (збільшення кількості еритроцитів у одиниці об'єму крові, згущування крові, тканинної гіпоксії та ін.). Усе це викликає утруднення кровообігу в мікросудинах, зміну тиску в них, що стимулює потовщення та структурну належність базальної мембрани судин. Таким чином, є пряма залежність між вмістом у крові глікованого гемоглобіну й ступенем діабетичної ангіопатії [3, 7].

Запропоновані та використовувані на даний час у галузі практичної охорони здоров'я методи визначення глікованого гемоглобіну людини виявляють різні субфракції. Одні лабораторії визначають гемоглобін HbA1, інші – HbA1c, треті – тотальний глікогемоглобін (GHb). Форма HbA1c кількісно переважає і тому найточніше відображає ситуацію [3].

Необхідно врахувати, що результат тесту може бути спотворений будь-якими чинниками, які впливають на середню тривалість життя еритроцитів (кровотечі, переливання крові, залізодефіцитна анемія та ін). Високий рівень глікованого гемоглобіну може бути симптомом не лише цукрового діабету, а й вираженого дефіциту заліза. Зниження рівня глікованого гемоглобіну відмічають при частих гіпоглікеміях, гемолітичній анемії, переливаннях крові, кровотечах.

На даний час почало все більше з'являтися публікацій щодо недоцільності надмірно жорсткого зниження рівня глікованого гемоглобіну, особливо в осіб старшої вікової групи та з наявністю серцево-судинної патології. Для хворих із супутньою серцево-судинною патологією рекомендовано рівень глікованого гемоглобіну 7,0-7,5 %, а для літніх людей – до 8,0 %. У даній категорії пацієнтів контроль за АТ є більш важливим, ніж контроль глікемії [4].

Метою дослідження було вивчити ефективність інсулінотерапії за показниками ступеня компенсації у пацієнтів із цукровим діабетом 1 та 2 типів у м. Тернополі й Тернопільській області.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Нами обстежено 258 хворих на цукровий діабет 1 та 2 типів. Тривалість діабету – від 2 до 25 років. Усі пацієнти отримували інтенсивну інсулінотерапію: Актрапідом і Протафаном, Хумодаром Р та Хумодаром В, Фармасуліном Н та Фармасуліном ННР і аналогами людських інсулінів (Новорапідом і Левеміром, Епайдрою та Лантусом).

Серед обстежених хворих 203 пацієнти проживали в сільській місцевості, 55 хворих – у м. Тернополі.

За віком хворих було поділено на три групи: 1-шу групу склали пацієнти віком від 20 до 30 років (35 осіб), 2-гу – від 30 до 50 років (97 осіб), 3-тю – старші 50 років (127 осіб).

З метою довготривалого моніторингу за перебігом цукрового діабету і контролю лікування хворих визначали рівень глікованого гемоглобіну (HbA1c). Для цього здійснювали забір капілярної крові з пальця. Аналіз проводили у зручний для пацієнтів час, використовуючи портативний апарат i-chroma з набором тест-смужок та реактивами цієї ж фірми. У зв'язку з тим, що в дослідженні брали участь 49,2 % пацієнтів, старших 50 років, показником компенсації цукрового діабету було взято такі критерії: HbA1c до 7,0 % – добра компенсація, 7,0-8,0 % – задовільна, понад 8,0 % – незадовільна.

Статистичну обробку отриманих даних проводили методами варіаційної статистики й кореляційного аналізу за допомогою пакета прикладних програм "Microsoft Excel for Windows 2000" на персональному комп'ютері "Pentium 4". Статистичний аналіз здійснювали з використанням критеріїв Фішера та Стюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Після визначення показників глікованого гемоглобіну отримано такі результати. Середній показник глікованого гемоглобіну у хворих на цукровий діабет становив: у жителів м. Тернополя – (9,33±0,11) %; жителів Козівського району – (9,03±0,05) %; пацієнтів з Бережанського району – (8,81±0,26) %; Підволочиського – (10,02±0,82) %; Збараського – (9,68±2,6) %; Тербовлянського – (10,95±1,2) %; Буцацького – (11,2±0,3) %; Чортківського – (10,27±0,1) %; Заліщицького – (11,2±1,4) %; Монастириського – (12,24±0,98) % відповідно. Середній HbA1c у хворих на цукровий діабет у Тернопільській області складав 10,2 %.

Серед обстежуваних хворих компенсованими виявилися 12 осіб, субкомпенсованими – 39, некомпенсованими – 207. У відсотковому співвідношенні кількість пацієнтів з HbA1c до 7 % становила 4,65 %, з HbA1c від 7,0 до 8,0 % – 15,11 %, з HbA1c понад 8,0 % – 80,23 % відповідно.

У пацієнтів, які отримували інсуліни Актрапід з Протафаном, середній показник глікованого гемоглобіну становив: у жителів м. Тернополя – (9,13±0,91) %; у жителів Козівського району – (9,5±1,05) %; Бережанського – (8,85±0,89) %; Підволочиського – (7,5±0,86) %; Збараського – (12,4±1,16) %; Тербовлянського – (9,72±1,12) %; Буцацького – (10,7±1,18) %; Чортківського – (10,3±0,86) %; Заліщицького

– (10,65±1,4) %; Монастириського – (12,95±0,23) % відповідно. У тих пацієнтів, які отримували Хумодар Р із Хумодаром В, середнє значення глікованого гемоглобіну складало: в обстежуваних м. Тернополя – (9,2±1,12) %; у хворих з Козівського району – (8,64±2,38) %; Бережанського – (9,06±1,98) %; Підволочиського – (10,82±3,89) %; Збаразького – (8,2±1,8) %; Тербовлянського – (10,7±3,9) %; Бучацького – (11,4±1,8) %; Чортківського – (10,09±2,91) %; Заліщицького – (12,8±0,31) %; Монастириського – (12,04±1,96) % відповідно.

Рівень глікованого гемоглобіну в пацієнтів, які страждали від цукрового діабету 1 або 2 типу й отримували Фармасулін Н та Фармасулін ННР, коливався в межах від 8,0 до 11,8 %. Так, в обстежуваних з м. Тернополя рівень HbA1c становив (8,0±1,98) %; у хворих з Козівського району – (8,39±1,71) %; Бережанського – (9,18±1,97) %; Підволочиського – (10,5±2,86) %; Збаразького – (10,04±4,16) %; Бучацького – (10,7±2,28) %; Чортківського – (11,8±2,93) %; Заліщицького – (10,2±0,4) %; Монастириського – (11,8±2,83) % відповідно. У Тербовлянському районі хворих, які отримували б Фармасулін Н та Фармасулін ННР, обстежено не було.

У пацієнтів, які отримували аналоги людських інсулінів, середній показник HbA1c становив: у жителів м. Тернополя – (10,97±1,58) %; жителів Козівського району – (9,1±0,1) %; Бережанського – (8,16±1,02) %; Збаразького – (8,1±0,1) %; Тербовлянського – (11,1±0,92) %; Чортківського – (10,4±1,86) %; Монастириського – (12,2±1,83) %. У Підволочиському, Бучацькому, Заліщицькому районах не було обстежено пацієнтів, які б отримували аналоги інсулінів.

Таким чином, для оцінки ступеня тривалої компенсації хворих на цукровий діабет 1 і 2 типів необхідно враховувати показники глікованого гемоглобіну.

ВИСНОВКИ. 1. Середній рівень глікованого гемоглобіну в обстежуваних жителів Тернопільської області склав 10,2 %, що свідчить про незадовільну компенсацію цукрового діабету. Компенсованими виявилися 4,65 % хворих, субкомпенсованими – 15,11 %, некомпенсованими – 80,83 %.

2. Найкращу компенсацію цукрового діабету відмічено серед жінок віком до 30 років, які здебільшого були мотивовані плановою вагітністю та отримували аналоги людських інсулінів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом // Под ред. И.И. Дедова, М.В. Шестаковой. – М.: Медицина, 2007. – 112 с.

2. Балаболкин М.И., Клебанова Е.М., Креминская В.М. Новые аспекты действия глимегирида у больных сахарным диабетом 2-го типа // Міжнар. ендокрин. журн. – 2010. – 2 (26). – С. 45-52.

3. Булатова С.В., Трельская Н.Ю., Бейкин Я.Б. и др. Результаты определения гликированного гемоглобина у больных сахарным диабетом // Клин. лаб. диагностика. – 2007. – № 9. – С. 61-62.

4. Власенко М.В. Сучасні аспекти корекції гіперглікемії у хворих на цукровий діабет 2-го типу // Міжнар. ендокрин. журн. – 2010. – 2 (26). – С. 24-34.

5. Ендокринологія / За ред. проф. П.М. Боднара. – Вінниця: Нова книга, 2010. – 464 с.

6. Тронько Н.Д., Ефимов А.С., Ткач С.Н. Пероральные сахароснижающие препараты и тактика их применения. – К., 2002. – 110 с.

7. ADVANCE collaborative group // N. Engl. J. Med. – 2008. – **358**. – P. 2560-2572.

Н.И. Швед, Н.В. Пасечко, Л.В. Наумова, А.О. Боб, О.И. Зарудна, И.В. Гольк
 ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

ПОКАЗАТЕЛИ ГЛИКИРОВАННОГО ГЕМОГЛОБИНА У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ В ТЕРНОПОЛЬСКОЙ ОБЛАСТИ

Резюме

В статье проведена оценка уровня гликированного гемоглобина у больных сахарным диабетом 1 и 2 типов в Тернопольской области. Показано, что средний уровень гликированного гемоглобина по Тернополь-

скої області склав 10,2 %. Компенсованими оказались 4,65 % пацієнтів, субкомпенсованими – 15,11 %, некомпенсованими – 80,83 %. Найлучший уровень компенсации показали больные, которые получали аналоги человеческого инсулинов. Среди областей наиболее компенсованими были пациенты с Бережанского района.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **сахарный диабет, гликированный гемоглобин.**

M.I. Shved, N.V. Pasiechko, L.V. Naumova, A.O. Bob, O.I. Zarudna, I.V. Holyk
I.YA. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

DATA OF GLYCOLIZED HEMOGLOBIN IN PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS AMONG THE POPULATION OF TERNOPIL REGION

Summary

The article deals with the estimation of glycolized hemoglobin level in patients with diabetes mellitus type 1 and 2 in Ternopil and Ternopil region. It is shown that medium level of HbA1c was 10,2 %. It was found that 4,65 % of patients have compensated disease, 15,11 % – subcompensated and 80,83 % – decompensated course of the disease. The best level of compensation was gained by the usage of analogs of human insulin. The highest percentage of the patients with compensated course of the disease is in the Berezhany region.

KEY WORDS: **diabetes mellitus, glycolized hemoglobin.**

Отримано 19.11.10

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

**ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ СТРУКТУРОУТВОРЮВАЧІВ НА ВМІСТ
МІНЕРАЛЬНИХ РЕЧОВИН У СУБЛІМОВАНОМУ ПОРОШКУ КАВУНА**

У статті наведено результати визначення макро- та мікроелементів сухих порошків кавуна, отриманих методом сублімаційного сушіння. Встановлено залежність їх вмісту від введеного структуроутворювача. Доведено доцільність введення структуроутворювачів при сублімаційному сушінні, що дозволяє зберегти більшу кількість корисних есенціальних елементів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: структуроутворювачі, мінеральні речовини, сублімовані порошки кавуна.

ВСТУП. Основними джерелами надходження мінеральних сполук до організму людини є рослини. В рослинах макро- і мікроелементи зв'язані з органічними сполуками, перебувають в оптимальному для організму співвідношенні, природніше, ніж синтетичні комплекси, вступають в обмін речовин, тому краще засвоюються. Макро- та мікроелементи здатні підсилювати терапевтичну активність біологічно активних речовин рослинної сировини [9].

Мінеральні речовини, які необхідні для життя певних живих організмів, називають есенціальними. В організмі людини знайдено 71 елемент, з яких есенціальними є 23. Вони входять до складу специфічних органічних сполук (ферментів, гормонів, вітамінів тощо) і часто зумовлюють їх хімічну та біологічну активність. Неорганічні сполуки беруть участь в утворенні тканин організму, клітинних оболонок, впливають на основні функції організму, зокрема на розмноження, ріст, розвиток тощо. Нестача тих чи інших мінеральних речовин призводить до різноманітних захворювань [2, 9].

Вивчення хімічного елементного складу фітосубстанцій має значення не тільки для оцінки їх можливої фармакологічної дії, а й для стандартизації та розробки методів контролю якості.

Багатим джерелом біологічно активних речовин є кавун звичайний. У ньому містяться: вода, органічні кислоти, цукри, пектинові

речовини; вітаміни – каротин, фолієва та аскорбінова кислоти, мінеральні речовини, жирні олії. Забарвлення м'якоті зумовлене наявністю дуже сильного антиоксиданта – лікопену та каротину [5-8, 11-13].

Слід зазначити, що даних про якісний та кількісний склад кавуна і субстанцій на його основі обмаль, що підкреслює актуальність досліджень. Крім того, важливим є дослідження впливу різних допоміжних речовин, які покращують технологічні властивості порошку кавуна [7], на вміст макро- та мікроелементів.

Метою даної роботи було вивчити мінеральний склад сублімованих порошків кавуна (СПК) і дослідити залежність вмісту макро- та мікроелементів від різних структуроутворювачів.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Об'єктом дослідження були сублімовані порошки кавуна з різними структуроутворювачами. Структуроутворювачі – сорбіт, лактозу, полівініловий спирт, натрію хлорид вводили після отримання соку кавуна шляхом розчинення або додавання по масі розчину-концентрату перед заморожуванням [4-8].

Визначення макро- і мікроелементів у ліофілізованих порошках кавуна проводили за допомогою атомно-абсорбційної спектроскопометрії [1, 3, 10].

Для кожного елемента окремо використовували найбільш чутливу довжину хвилі: Cu – 324,7 нм, Fe – 248,3 нм, K – 766,5 нм, Ca – 422,7 нм, Co – 240,7 нм, Mg – 285,2 нм,

Mn – 279,5 нм, Na – 589 нм, Ni – 232,0 нм, Zn – 213,9 нм.

Концентрацію елементів у пробі визначають за калібрувальним графіком і розраховували за формулою:

$$C = \frac{C_x \times V}{p}$$

де V – об'єм розчину, мл;

p – наважка досліджуваних речовин, г;

C_x – концентрація з калібрувального графіка, мг/кг;

C – концентрація елементів, мг/кг.

Допускається відхилення між паралельними двома результатами в серії дослідження не більше 5 %.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Якісний склад та кількісний вміст макро- і мікроелементів у сублімованих порошках кавуна з різними структуроутворювачами наведено в таблиці.

Було визначено 10 елементів та встановлено їх кількісний вміст (мг/100 г). У найбільшій збалансованій фізіологічній кількості в сировині й сублімованих порошках кавуна містяться макроелементи – магній і калій та мікроелементи – манган, залізо, цинк, мідь, кобальт і нікель (табл.).

Найбільший вміст різних елементів характерний для сублімованих порошків кавуна, які отримано з використанням структуроутворювачів – лактози і сорбіту. Так, СПК з лактозою містить більшу кількість заліза, магнію, мангану, кальцію, калію, натрію та нікелю, а СПК із сорбітом – міді, цинку, кобальту. Але слід зазначити, що за вмістом всіх елементів сублімовані порошки кавуна із сорбітом і лактозою мають переваги над СПК з полівініловим спиртом та натрію хлоридом.

Процес ліофілізації з допоміжними речовинами дозволяє вилучити з кавуна стабільну кількість макро- та мікроелементів. Введення структуроутворювачів сприяє кріопротекторній дії, крім того, можна припустити, що лактоза і сорбіт попереджують процеси окиснення і різну хімічну взаємодію.

Заслужують на увагу високий вміст макроелементів у всіх СПК – магнію і калію та досить невеликий вміст натрію. Це підтверджує відомий факт використання свіжого кавуна при набряках, пов'язаних із захворюваннями серцево-судинної системи й нирок [8]. Можна припустити, що аналогічну дію буде проявляти сублімований порошок кавуна.

Магній є активатором багатьох ферментативних процесів (регулює реакції фосфорного обміну, гліколізу, синтезу білків, жирних кис-

Таблиця – Результати визначення макро- і мікроелементів у сублімованих порошках кавуна

Об'єкт дослідження	Елемент, мг/100 г									
	Fe	Cu	Mg	Mn	Zn	Ca	K	Na	Co	Ni
Сублімований порошок кавуна	170,5± 0,02	2,54± 0,01	243,8± 0,02	4,37± 0,01	3,08± 0,01	20,8± 0,02	76,5± 0,02	27,7± 0,01	1,49± 0,01	4,45± 0,01
Сублімований порошок кавуна + лактоза	259,4± 0,01	4,01± 0,02	283,0± 0,02	6,30± 0,02	4,22± 0,01	29,3± 0,02	140,3± 0,02	49,3± 0,02	1,76± 0,02	5,68± 0,02
Сублімований порошок кавуна + сорбіт	236,5± 0,01	4,03± 0,02	249,2± 0,02	6,17± 0,01	4,55± 0,02	27,8± 0,02	114,9± 0,02	46,3± 0,02	1,78± 0,01	5,62± 0,01
Сублімований порошок кавуна + натрію хлорид	120,4± 0,02	2,34± 0,02	211,2± 0,01	2,64± 0,02	2,52± 0,01	13,6± 0,01	34,7± 0,02	Не визначали	2,10± 0,01	5,01± 0,01
Сублімований порошок кавуна + полівініловий спирт	159,4± 0,02	3,13± 0,02	246± 0,01	4,53± 0,01	3,40± 0,01	26,4± 0,02	86,5± 0,01	39,7± 0,02	1,54± 0,01	5,10± 0,01

лот і ліпідів, впливає на синтез і розпад нуклеїнових кислот), потрібний для нормального функціонування нервової і м'язової тканин, проявляє седативну дію на нервову систему, уповільнює серцеву діяльність, активізує обмін у тканинах, функцію ретикулярної системи, підсилює імунітет і фагоцитоз. Калій бере участь

у внутрішньоклітинному обміні, регулюванні водно-електролітного балансу, обміну та осмотичного тиску. Його концентрація в клітинах на порядок вища, ніж поза клітиною, головною функцією калію є формування трансмембранного потенціалу шляхом обміну з іонами натрію [2, 9].

Можна припустити, що використання сублімованих порошків кавуна буде корисним при нестачі калію та магнію.

Слід також відзначити наявність значної кількості елементів, які впливають на процеси кровотворення та імунну систему.

Залізо входить до складу гемоглобіну крові, міоглобіну, каталази цитохромів. Його солі стимулюють кровотворну функцію кісткового мозку; залізо в складі гемоглобіну забезпечує постійне поглинання і віддачу кисню та підтримує клітинне дихання. Кобальт є основною частиною вітаміну В₁₂, пришвидшує утворення гормонів щитоподібної залози, підсилює утворення білків м'язової тканини, сприяє накопиченню деяких вітамінів, бере участь у процесах росту і розмноження. Манган підсилює білковий обмін, пригнічує активність ліпідного обміну, підвищує фагоцитарну активність, мобілізує імунореактивні сили організму, стимулює синтез гіалуронової кислоти. При нестачі мангану спостерігаються порушення процесів розмноження, росту і розвитку, еритропоезу, сперматогенезу, менструального циклу, атрофія сім'яників. Мідь відіграє важливу роль в окисно-відновних процесах, є складовою частиною таких життєво важливих ферментів, як церулоплазмін, цитохромоксидаза, лізілоксидаза, проявляє позитивну дію на ріст, фагоцитарну активність крові й імунологічні показники. При нестачі міді уповільнюються процеси синтезу білка, порушуються функції органів кровотворення і розмножен-

ня, уповільнюється ріст. Приймання нікелю призводить до значного збільшення вмісту еритроцитів, гемоглобіну і підсилення регенераційної функції кровотворних органів [2, 9].

Результати дослідження свідчать про те, що сублімовані порошки кавуна є збалансованим джерелом вказаних мікроелементів і будуть корисними при нестачі цих мікроелементів в організмі людини.

Порівнюючи вміст макро- та мікроелементів у сублімованих порошках кавуна, їх можна розташувати в такій послідовності: магній > залізо > калій > натрій > кальцій > манган > нікель > цинк > мідь > кобальт.

ВИСНОВКИ. Уперше проведено комплексне дослідження з визначення макро- та мікроелементів сухих порошків кавуна, отриманих методом сублімаційного сушіння. Встановлено залежність вмісту макро- та мікроелементів від введеного структуроутворювача. Доведено доцільність введення структуроутворювачів при сублімаційному сушінні, що дозволяє зберегти більшу кількість корисних есенціальних елементів. У сублімованих порошках кавуна міститься збалансована кількість елементів, що впливають на нормальне функціонування серцево-судинної системи, а саме: магнію, заліза, калію, нікелю та кобальту. Отримані експериментальні дані будуть використані для прогнозування і планування фармакологічних досліджень та розробки відповідних проектів МКЯ.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Брицке М.Э. Атомно-абсорбционный спектрохимический анализ. – М.: Химия, 1982.
2. Гонський Я.І., Максимчук Т.П. Біохімія людини: Підручник. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2001. – 736 с.
3. Лабінський А.Й., Гаєвський В.Г., Сочій П.Г. Кількісне визначення мікроелементів у тканинах та біологічних рідинах методом прямого емісійного спектрального аналізу // Фармац. журн. – 1984. – № 3. – С. 42-44.
4. Пат. 46453 А Україна, А 61 К 36/00. Спосіб отримання фітосубстанції на основі кавуна звичайного / Соколова Л.В., Горобець С.В., Вовчук О.О., Тихонова С.О., Скрипник-Тихонов Р.І., Шаповал О.М., Лукієнко О.В. – № u 2009 06117; заявл. 15.06.09; опубл. 25.12.2009, Бюл. № 24. – 4 с.

5. Соколова Л.В. Органолептичні та фізико-хімічні властивості відновленого соку кавуна порівняно зі свіжим // Фармац. часопис. – 2009. – № 3. – С. 53-55.

6. Соколова Л.В. Фітосубстанція кавуна – перспективне джерело мінеральних речовин // Запорж. мед. журн. – 2009. – **11**, № 2. – С. 110-111.

7. Соколова Л.В., Вовчук О.О. Вивчення кристалографічних характеристик ліофілізованих порошків кавуна звичайного // Фармац. часопис. – 2007. – № 2. – С. 61-64.

8. Соколова Л.В., Горобець С.В. Фармакологічна дія кавуна та аналіз номенклатури лікарських препаратів і біологічно активних добавок на його основі // Фармац. часопис. – 2009. – № 2. – С. 74-77.

9. Фармакогнозія. Лікарська рослинна сировина та фітозасоби / За ред. П.І. Середи. – Вінниця: НОВА КНИГА, 2006. – 352 с.

10. Хавезов И., Цалев Д. Атомно-абсорбционная спектроскопия: Пер. с болгарского. – Ленинград: Химия, 1983.

11. Motes J.E., Damicone John Roberts, Warren Duties Jim, Edelson Jonathan / Watermelon Production.

Oklahoma Cooperative Extension Service. – Retrieved Jul. – 2005.

12. Parsons, Jerry, Ph.D. (June 5, 2002) / Gardening Column: Watermelons. Texas Cooperative Extension of the Texas A&M University System. – Jul. – 2005.

13. Watermelon History. National Watermelon Promotion Board website. Retrieved Jul. – 2005.

Л.В. Соколова

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ СТРУКТУРООБРАЗОВАТЕЛЕЙ НА СОДЕРЖАНИЕ МИНЕРАЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ В СУБЛИМИРОВАННОМ ПОРОШКЕ АРБУЗА

Резюме

В статье представлены результаты определения макро- и микроэлементов сухих порошков арбуза, полученных методом сублимационной сушки. Установлена зависимость их содержания от введенного структурообразователя. Доказана целесообразность введения структурообразователей при сублимационной сушке, что позволяет сохранить значительное количество полезных эссенциальных элементов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: структурообразователи, минеральные вещества, сублимированные порошки арбуза.

L.V. Sokolova

I.YA. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

THE INVESTIGATION OF STRUCTURE-CREATORS INFLUENCE ON THE CONTENT OF MINERAL SUBSTANCES IN THE SUBLIMATED POWDER OF WATER MELON

Summary

In the article there are presented results of the determination of macro- and microelements of dry powder of water melon, which has been received by the method of sublimation drying. It has been established the dependents of their contents from insertion the structure-creator. It has been proved the expediency of the insertion of structure-creators during sublimation, that allows to keep more useful essential elements.

KEY WORDS: structure-creators, mineral substances, sublimated powder of water melon.

Отримано 16.11.10

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

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

РОЗПОДІЛ АСКОРБІНОВОЇ КИСЛОТИ В ТКАНИНАХ ЩУРІВ ПРИ ЗАПАЛЕННІ

Було досліджено вміст аскорбінової кислоти в плазмі крові й тканинах щурів при запаленні. Виявлено зменшення рівня аскорбінової кислоти в надниркових залозах, здоровій ділянці м'яза та зростання в ділянці м'яза з флегмоною порівняно з контролем, а також істотне збільшення (на 76 %) вмісту аскорбату в ураженій ділянці м'яза порівняно зі здоровою.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: аскорбінова кислота, кров, тканини, запалення.

ВСТУП. Аскорбінова кислота (АК) відіграє важливу роль у забезпеченні фагоцитарної функції лейкоцитів. Утворення активних форм кисню (АФК) у фагоцитах, особливо в нейтрофілах, відбувається за рахунок стимуляції аскорбіновою кислотою пентозофосфатного шляху окиснення глюкози. При цьому утворюється NADPH, який використовується NADPH-оксидазою для продукування супероксидного аніона [5]. Інтенсивне поглинання нейтрофілами вітаміну С супроводжується утворенням бактерицидних вільнорадикальних субстанцій, які знищують передракові клітини, бактеріальні, вірусні та інші чужорідні агенти [6]. Концентрація вітаміну С в нейтрофілах, моноцитах та лімфоцитах в 14 разів вища порівняно з плазмою крові [7]. Нейтрофіли складають найчисленнішу групу лейкоцитів крові (50-70 %). Проте не більш ніж 1 % загальної кількості нейтрофілів циркулює у крові. Більша їх частина акумулюється в тканинах. Вони першими з'являються в місці запалення. Зважаючи на високу концентрацію АК у нейтрофілах та їх швидку міграцію до місця запалення, можна припустити, що розподіл АК у тканинах при запаленні буде, певною мірою, відображати ступінь прояву процесу запалення.

У зв'язку з цим, метою роботи було вивчення вмісту АК у тканинах щурів при запаленні.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. В експерименті було використано 12 статевозрілих щурів лінії Вістар масою 200-250 г, яких утримували у стандартних умовах віварію. Тварин поділили на 2 групи: контрольну (інтактну) та дослідну. В щурів дослідної групи викликали запалення шляхом внутрішньом'язового введення ліпополісахариду (ЛПС) в дозі 2 мг/100 г [3]. Через добу після введення ЛПС (фаза, що відповідає максимальній лейкоцитарній реакції) тварин декапітували гільйотинним ножем під слабким ефірним наркозом.

© Л.Д. Попова, І.М. Васильєва, 2010.

Вміст аскорбінової кислоти в плазмі крові й тканинах досліджували титриметричним методом [2], оснований на здатності АК кількісно відновлювати забарвлений окиснений 2,6-дихлорфеноліндофенол до безбарвної лейкоформи.

Статистичний аналіз отриманих результатів було проведено за допомогою пакета прикладних програм Statistica, MS Excel з використанням U-критерію Манна-Уїтні.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Було виявлено, що вміст вітаміну С у крові, нирках, печінці у тварин контрольної та дослідної груп не відрізнявся (табл. 1).

Аскорбінова кислота не є незамінним фактором харчування у щурів. Вона синтезується в печінці та депонується в надниркових залозах [1]. Зниження вмісту аскорбінової кислоти у надниркових залозах свідчить про виснаження резерву АК при запаленні.

Дослідження вмісту АК у м'язах свідчить про перерозподіл вітаміну С між здоровою ділянкою м'язів та ділянкою, ураженою запаленням (табл. 2).

Вміст аскорбату в здоровій ділянці м'язів зменшувався на 27 %, а в ділянці, ураженій флегмоною, збільшувався на 29 % порівняно з контролем. Вміст аскорбату в ураженій ділянці м'яза перевищував рівень у здоровій ділянці на 76 %. Цей перерозподіл, напевно, пов'язаний з міграцією нейтрофілів до місця ураження і насиченням їх аскорбіновою

Таблиця 1 – Вміст аскорбінової кислоти в плазмі крові (мкмоль/л) та органах (нмоль/г) щурів при запаленні

Рідини або тканини	Група тварин	Кількість спостережень n	Медіана Me	Квартілі 25 %; 75 %
Плазма крові	Контрольна	6	39,63	34,55; 43,47
	Дослідна	6	32,61	28,86; 36,48
Печінка	Контрольна	6	4,42	4,23; 4,62
	Дослідна	6	4,24	4,05; 4,55
Нирки	Контрольна	6	1,23	1,13; 1,70
	Дослідна	6	1,11	0,99; 1,16
Надниркові залози	Контрольна	6	9,47	8,72; 9,79
	Дослідна	6	7,25*	6,88; 7,85

Примітка. * – різниця достовірна порівняно з контролем.

Таблиця 2 – Вміст аскорбінової кислоти (нмоль/г тканини) у м'язах щурів при запаленні

Група тварин		Кількість спостережень n	Медіана Me	Квартілі 25 %; 75 %
Контрольна		5	2,96	2,78; 3,13
Дослідна	Здорова ділянка м'яза	5	2,16*	1,82; 2,50
	Ділянка, уражена запаленням	5	3,81**	3,47; 3,92

Примітка. * – різниця достовірна порівняно з контролем, ** – різниця достовірна порівняно зі здоровою ділянкою м'язів.

кислотою. Отримані результати узгоджуються з даними [4], згідно з якими АК діє як прооксидантний терапевтичний агент при інфекціях. Проте прояв прооксидантних та антиоксидантних ефектів АК може залежати від її концентрації. У зв'язку з цим, у подальшому планується вивчення прооксидантного та антиоксидантного ефектів АК залежно від дози на морських свинках, тому що їх організм, подібно до організму людини, не здатний синтезувати аскорбінову кислоту. Екстраполяція на люди-

ну даних з вивчення АК, отриманих на морських свинках, буде більш коректною.

ВИСНОВОК. При запаленні відбувається локальна акумуляція аскорбінової кислоти в місці запалення, що, напевно, пов'язано з посиленою міграцією нейтрофілів та їх здатністю до насичення аскорбатом, а також збільшується використання аскорбінової кислоти, про що свідчить зменшення її концентрації в надниркових залозах.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.

1. Лабораторные животные / [И.П. Западнюк, В.И. Западнюк, Е.А. Захария, Б.В. Западнюк]. – К. : Вища школа, 1983. – С. 383.
2. Методы определения аскорбиновой кислоты // Руководство по методам анализа качества и безопасности пищевых продуктов / под ред. И.М. Скурихина, В.А. Тутельяна. – М. : Медицина, 1998. – С. 168-182.
3. Морфофункциональная характеристика реакции иммунной системы крыс Вистар после воздействия сублетальной дозы липополисахарида / А.И. Яблонская, О.В. Макарова, Л.И. Михайлова [и др.] // Иммунология. – 2009. – № 3. – С. 145-147.
4. Ascorbate in pharmacologic concentrations generates ascorbate radical and hydrogen peroxide in

extracellular fluid in vitro / Q. Chen, M.G. Espey, A. Sun [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2007. – **104**, № 21. – P. 8749-8754.

5. Harper's Biochemistry / [R.K. Murray, D.K. Granner, P.A. Mayes, V.W. Rodwell]. – New Jersey: Prentice Hall, 1996. – 868 p.

6. Moser R. Uptake of ascorbic acid by human granulocytes / R. Moser, F. Weder // Int. Archs Allergy Appl. Immun. – 1986. – **81**. – P. 46-48.

7. Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells. Action as a pro-drug to deliver peroxide to tissues / Q. Chen, M.G. Espey, M.C. Krishna [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2005. – **102**, № 38. – P. 13 604-13 609.

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ В ТКАНЯХ КРЫС ПРИ ВОСПАЛЕНИИ

Резюме

Было исследовано содержание аскорбиновой кислоты в плазме крови и тканях крыс при воспалении. Обнаружено уменьшение уровня аскорбиновой кислоты в надпочечниках, здоровой области мышцы и возрастание в участке мышцы с флегмоной по сравнению с контролем, а также существенное увеличение (на 76 %) содержания аскорбата в пораженном участке мышцы по сравнению со здоровым.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: аскорбиновая кислота, кровь, ткани, воспаление.

L.D. Popova, I.M. Vasylyeva
KHARKIV NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY

ASCORBIC ACID DISTRIBUTION IN TISSUES OF RATS IN CASE OF INFLAMMATION

Summary

Ascorbic acid level has been investigated in blood plasma and tissues of rats in case of inflammation. The decrease of ascorbate level in adrenal glands and normal muscle area and the increase of that in area with phlegmon have been found. Considerable increasing (76 %) of ascorbate level in damage muscle area compared with normal one has been found.

KEY WORDS: ascorbic acid, blood, tissues, inflammation.

Отримано 27.09.10

Адреса для листування: Л.Д. Попова, вул. Іллінська, 57, кв. 97, Харків, 61093, Україна.