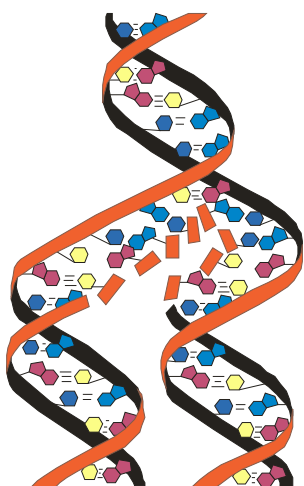


Всеукраїнська громадська наукова організація "Українська академія наук"
ДВНЗ "Тернопільський державний медичний університет
імені І. Я. Горбачевського МОЗ України"

МЕДИЧНА ХІМІЯ

НАУКОВИЙ ЖУРНАЛ



All-Ukrainian Public Scientific Organization
"Ukrainian Academy of Sciences"
SHEI "I. Ya. Horbachevsky Ternopil State Medical University MPH of Ukraine"

MEDICAL CHEMISTRY

SCIENTIFIC JOURNAL

3(52) TOM 14
2012

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

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

МЕДИЧНА ХІМІЯ

Науковий журнал

MEDICAL CHEMISTRY

Scientific Journal

ISSN 1681-2557

Виходить щоквартально
Published 4 times per year

Заснований у грудні 1999 року
Founded in December 1999

Свідоцтво про державну реєстрацію: серія KB № 3647 від 26.01.1999 р.
Certificate of state registration:
series KB № 3647 from 26.01.1999

Передплатний індекс: 22869
Subscription index: 22869

Відповідно до постанови Президії ВАК України № 1-05/3 від 14.04.2010 р. журнал "Медична хімія" внесений до переліку фахових видань, в яких можуть публікуватися результати дисертаційних робіт на здобуття наукових ступенів доктора і кандидата медичних і біологічних наук.

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

Рекомендовано до видання вченою радою ДВНЗ "Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України" (протокол № 1 від 30 серпня 2012 р.).

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

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

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

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

© Науковий журнал "Медична хімія", 2012
© Scientific Journal "Medical Chemistry", 2012

Зміст

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Майданник В. Г., Бурлака Є. А., Ганусевич І. І. (Київ, Stockholm) МЕХАНІЗМИ ПРОГРЕСУВАННЯ ПОШКОДЖЕННЯ НИРОК ПРИ ХРОНІЧНОМУ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТІ У ДІТЕЙ

5

Бурлака А. П., Кучменко О. Б., Петухов Д. М., Ганусевич І. І., Лукін С. М., Лук'янчук Є. В., Сидорик Є. П., Делемєнчук Н. В., Донченко Г. В. (Київ) ВПЛИВ КОМПЛЕКСУ ПОПЕРЕДНИКІВ І МОДУЛЯТОРА БІОСИНТЕЗУ УБІХІНОНУ НА СИСТЕМУ ЦЕРУЛОПЛАЗМІН/ТРАНСФЕРІН, ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНЕ ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ І БІЛКІВ ТА АКТИВНІСТЬ МАТРИКСНИХ МЕТАЛОПРОТЕЇНАЗ У КРОВІ ТВАРИН ЗА ВВЕДЕННЯ ДОКСОРУБІЦИНУ

11

Мончак І. Л., Ядловський О. Є., Бухтіарова Т. А. (Київ) ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ДИКЛОФЕНАКУ ТА АМІЗОНУ НА TRPV1 ВОРИТНОЇ ВЕНИ

16

Пивоваренко Ю. В., Шаблякин О. В., Васильєв О. М. (Київ) ПРИРОДА ВЗАЄМОДІЇ МІЖ КАТІОННИМИ N-ОКСИДФЕНАЗИНАМИ ТА ДНК

20

Хара М. Р., Усинський Р. С. (Тернопіль) МЕТАБОЛІЗМ АЦЕТИЛХОЛІНУ В ПОШКОДЖЕНОМУ АДРЕНАЛІНОМ МІОКАРДІ САМЦІВ І САМОК ЩУРІВ ЗА ЗАСТОСУВАННЯ БЛОКАТОРА АТФ-ЧУТЛИВИХ КАЛІЄВИХ КАНАЛІВ ГЛІБЕНКЛАМІДУ ТА БЛОКАТОРА КАЛЬЦІЄВИХ КАНАЛІВ ВЕРАПАМІЛУ

25

Федорович З. Я., Фафула Р. В., Личковський Е. І., Воробець З. Д. (Львів) МОДЕЛЮВАННЯ ДИНАМІКИ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННОЇ КОНЦЕНТРАЦІЇ ІОНІВ Na⁺, K⁺, Cl⁻, Ca²⁺, H⁺ ТА МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦІАЛУ ЛІМФОЦИТІВ

30

Хара М. Р., Росоловська С. О. (Тернопіль) ВПЛИВ ЗАМІСНОЇ ТЕРАПІЇ НА СТАН МІНЕРАЛЬНОГО СКЛАДУ КІСТОК ВЕРХНЬОЇ ТА НИЖНЬОЇ ЩЕЛЕПИ У ГОНАДЕКТОМОВАНИХ САМЦІВ І САМИЦЬ ЩУРІВ

35

Дармограй Н. М. (Львів) ВИВЧЕННЯ УМОВ ЕКСТРАКЦІЇ АГОМЕЛАТИНУ ОРГАНІЧНИМИ РОЗЧИННИКАМИ

40

Рубан А. М., Казанець А. І., Крупська Т. В., Туров В. В. (Київ) МІЖФАЗНІ ВЗАЄМОДІЇ ВІТРЕОРЕТИНАЛЬНОГО СИЛІКОНУ З РОЗЧИНОМ ГІАЛУРОНОВОЇ КИСЛОТИ

44

Максимиук Г. В., Воробець З. Д., Максим'юк В. М. (Львів, Львів-Оброшино) ГОМЕОСТАЗ ІОНІВ СОЛЕЙ ЛУЖНИХ МЕТАЛІВ НАТИВНОЇ СПЕРМИ

48

Романовська І. І., Сотникова О. П., Декіна С. С., Шестеренко Є. А. (Одеса) ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ Й ОФТАЛЬМОПЕШКІДЛИВІСТЬ ОЧНОЇ ЛІКАРСЬКОЇ МАЗІ З ЛІЗОЦИМОМ

52

Підручна С. Р., Захарчук У. М., Кулянда О. О. (Тернопіль) ЗМІНИ ПОКАЗНИКІВ НЕСПЕЦИФІЧНОЇ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ОРГАНІЗМУ ПРИ ТЯЖКІЙ ТА КОМБІНОВАНИЙ ТРАВМІ

56

Ніколаєнко Т. В., Бесараб І. В., Почтарьова Г. О., Непийвода Х. Д., Лаврова К. В., Ступак Ю. А., Томачинська Л. І., Гарманчук Л. В. (Київ) ВПЛИВ ІОНІВ СВИНЦЮ НА ПОКАЗНИКИ ГЕПАТОБІЛІАРНОЇ СИСТЕМИ ТА АЗОТИСТОГО КАТАБОЛІЗМУ

60

Contents

ORIGINAL INVESTIGATIONS

Maidannyk V. H., Burlaka Ye. A., Hanusevych I. I. (Kyiv, Stockholm) MECHANISMS OF THE KIDNEY DAMAGES PROGRESSION IN CHRONIC GLOMERULONEPHRITIS IN CHILDREN

Burlaka A. P., Kuchmenko O. B., Petukhov D. M., Hanusevych I. I., Lukin S. M., Lukiyanchuk Ye. B., Sydoryk Ye. P., Delemenchuk N. V., Donchenko H. V. (Kyiv) THE EFFECT OF COMPLEX OF PRECURSORS AND MODULATORS OF UBIQUINONE BIOSYNTHESIS ON CERULOPLASMIN/ TRANSFERRIN, FREE-RADICAL PROTEIN AND LIPID PEROXIDATION, AND MATRIX METALLOPROTEINASE ACTIVITY IN ANIMAL BLOOD UNDER DOXORUBICIN TREATMENT

Monchak I. L., Yadlovskiy O. Ye., Buhtiarova T. A. (Kyiv) THE EFFECT OF AMIZON AND DICLOFENAC ON TRPV1 OF PORTAL VEIN

Pivovarenko Yu. V., Shablykin O. V., Vasylyev O. M. (Kyiv) NATURE OF INTERACTION BETWEEN THE CATION N-OXIDPHENAZINES AND NUCLEIC ACIDS

Khara M. R., Usynskiy R. S. (Ternopil) ACETYLCHOLINE METABOLISM IN EPINEPHRINE-DAMAGED MYOCARD OF MALE AND FEMALE RATS IN USAGE OF ATP-SENSITIVE CHANNELS BLOCKER GLIBENCLAMID AND CALCIUM CHANNELS BLOCKER OF VERAPAMIL

Fedorovych Z. Ya., Fafula R. V., Lychkovskiy E. I., Vorobets Z. D. (Lviv) MODELING OF DYNAMICS OF INTERNAL Na⁺, K⁺, Cl⁻, Ca²⁺, H⁺ IONS CONCENTRATION AND MEMBRANE POTENTIAL OF LYMPHOCYTE

Khara M. R., Rosolovska S. O. (Ternopil) EFFECT OF REPLACEMENT THERAPY ON THE STATE OF MINERAL BONES COMPOSITION OF THE UPPER AND LOWER JAWS IN GONAECTOMIZED MALE AND FEMALE RATS

Darmohrai N. M. (Lviv) INVESTIGATION CONDITIONS OF EXTRACTION OF AGOMELATINE BY ORGANIC SOLVENTS

Ruban A. M., Kazanets A. I., Krupskaya T. V., Turov V. V. (Kyiv) INTERPHASE INTERACTION OF VITREORETINALIC SILICONE WITH A SOLUTION OF HYALURONIC ACID

Maksymiuk H. V., Vorobets Z. D., Maksymyuk V. M. (Lviv, Lviv-Obroshyno) HOMEOSTASIS OF IONS OF THE ALKALI METAL SALTS IN THE NATIVE SPERM

Romanovska I. I., Sotnykova O. P., Dekina S. S., Shesterenko Ye. A. (Odesa) PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES AND OPHTHALMOINNOCECE OF OCULAR MEDICINAL OINTMENT WITH LYSOZYME

Pidruchna S. R., Zaharchuk U. M., Kulianda O. O. (Ternopil) CHANGES OF INDICES OF NON-SPECIFIC RESISTANCE OF THE ORGANISM AT SEVERE AND COMBINED TRAUMA

Nikolayenko T. V., Besarab I. V., Pochtariova H. O., Nepiyvoda Kh. D., Lavrova K. V., Stupak Yu. A., Tomachynska L. I., Harmanchuk L. V. (Kyiv) EFFECT OF LEAD IONS ON INDICATORS OF HEPATOBILIARY SYSTEM AND NITROGEN CATABOLISM

Кліщ І. М., Погорецька Х. В., Куліцька М. І. (Тернопіль)
ВІКОВІ ОСОБЛИВОСТІ ВПЛИВУ ПАРАЦЕТАМОЛУ
НА ДЕЯКІ ПОКАЗНИКИ ПЕРОКСИДНОГО
ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ ТА АНТИОКСИДАНТНОЇ
СИСТЕМИ У ЩУРІВ

64

Klishch I. M., Pohoretska H. V., Kulitska M. I. (Ternopil)
THE AGE PECULIARITIES OF PARACETAMOL
INFLUENCE ON LIPID PEROXIDATION AND
ANTIOXIDANT SYSTEM PARAMETERS IN WHITE
RATS

Посохова К. А., Зозуляк Н. Б., Ніколаєва В. В.
(Тернопіль) МЕТАБОЛІЧНІ ПОРУШЕННЯ ПРИ
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТИ
2 ТИПУ ТА ПРИЗНАЧЕННІ ВОДОРОЗЧИННОЇ
ФОРМИ КВЕРЦЕТИНУ

69

Posokhova K. A., Zozulyak N. B., Nikolayeva V. V.
(Ternopil) METABOLIC DISORDERS AT EXPERIMENTAL
DIABETES MELLITUS OF TYPE 2 AND UNDER
THE INFLUENCE OF WATER SOLUBLE FORM
OF CUERCETIN

Вовк Т. Б., Бурлова-Васильєва Н. К., Остапченко Л. І.
(Київ) ОСОБЛИВОСТІ ФУНКЦІОНУВАННЯ ТРОМБО-
ЦИТІВ ЗА УМОВ РОЗВИТКУ СИСТЕМНОГО
ЧЕРВОНОГО ВОВЧАКА

73

Vovk T. B., Burlova-Vasylieva N. K., Ostapchenko L. I.
(Kyiv) ASPECTS OF PLATELET BEHAVIOR UNDER
SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS

Щерба В. В., Корда М. М. (Тернопіль) ЗАСТОСУВАННЯ
ІНГІБІТОРА ІНДУЦИБЕЛЬНОЇ СИНТАЗИ ОКСИДУ
АЗОТУ N-(3-(АМІНОМЕТИЛ)БЕНЗИЛ)АЦЕТАМІДИНУ
ПРИ ЛІПОПОЛІСАХАРИДНОМУ ЗАПАЛЕННІ ТКАНИН
ПАРОДОНТА

76

Shcherba V. V., Korda M. M. (Ternopil) APPLICATION
OF INOS INHIBITOR N-(3-(AMINOMETHYL)BEN-
ZYL)ACETAMIDINE AT LIPOPOLYSACCHARYDE
INFLAMMATION OF PARODONTIUM TISSUE

Авдєєв О. В. (Тернопіль) СТАН ЕНДОГЕННОЇ
ІНТОКСИКАЦІЇ У ТВАРИН РІЗНОГО ВІКУ З ГІПО-
І ГІПЕРЕРГІЧНИМ ПАРОДОНТИТОМ

80

Avdieiev O. V. (Ternopil) STATE OF ENDOGENOUS
INTOXICATION FOR ANIMALS OF DIFFERENT AGE
WITH HYPO- AND HYPERERGIC PARODONTITIS

Сікорин У. Б. (Івано-Франківськ) ОДЕРЖАННЯ
І СТАНДАРТИЗАЦІЯ ЕКСТРАКТІВ СТАРОДУБА
ШИРОКОЛИСТОГО

83

Sikoryn U. B. (Ivano-Frankivsk) RECEIPT AND
STANDARTIZATION OF EXTRACTS OF LASERPITUM
LATIFOLIUM

Козак Д. В., Гудима А. А. (Тернопіль) ВПЛИВ
ПОЛІТРАВМИ НА ДИНАМІКУ РАНЬОГО
АПОПТОЗУ ТКАНИННИХ ЛІМФОЦИТІВ

86

Kozak D. V., Hudyma A. A. (Ternopil) EFFECT
OF POLYTRAUMA ON DYNAMICS OF EARLY
APOPTOSIS IN TISSUE LYMPHOCYTES

Татарчук Л. В. (Тернопіль) ОСОБЛИВОСТІ
СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНИХ ЗМІН
В АРТЕРІЯХ ШЛУНОЧКІВ СЕРЦЯ ПРИ
ПОСТРЕЗЕКЦІЙНІЙ ЛЕГЕНЕВІЙ ГІПЕРТЕНЗІЇ

89

Tatarchuk L. V. (Ternopil) PECULIARITIES OF
STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHANGES
IN ARTERIES VENTRICLES OF THE HEART AT
POSTRESECTION PULMONARY HYPERTENSION

Уліщенко Є. О., Бражко О. А., Омелянчик Л. О.,
Генчева В. І., Бражко О. О. (Запоріжжя) ВІРТУАЛЬНИЙ
СКРИНІНГ ТА СИНТЕЗ НОВИХ N-АЦИЛЬНИХ
ПОХІДНИХ S-(2-МЕТИЛХІНОЛІН-4-ІЛ)-L-ЦИСТЕЇНУ
ЯК ПОТЕНЦІЙНИХ БІОРЕГУЛЯТОРІВ
НАПРАВЛЕНОЇ ДІЇ

94

Ulishchenko Ye. O., Brazhko O. A., Omelyanchyk L. O.,
Hencheva V. I., Brazhko O. O. (Zaporizhzhya) VIRTUAL
SCREENING AND SYNTHESIS OF N-ACYL
DERIVATIVES OF S-(2-METHYLQUINOLIN-4-YL)-L-
CYSTEINE AS POTENTIAL BIOREGULATORS OF THE
DIRECTED ACTION

ПРОБЛЕМИ І ДОСВІД ВИКЛАДАННЯ БІОХІМІЇ

Марценюк В. П., Сельський П. Р. (Тернопіль)
АНАЛІЗ ОБ'ЄКТИВНОСТІ НОВІТНІХ МЕТОДИК
ОЦІНЮВАННЯ ПРИ ВИКЛАДАННІ БІОЛОГІЧНОЇ
ТА БІООРГАНІЧНОЇ ХІМІЇ

100

PROBLEMS AND EXPERIENCE OF BIOCHEMISTRY TEACHING

Martsenyuk V. P., Selskyi P. R. (Ternopil) THE
OBJECTIVITY ANALYSIS OF INNOVATIVE
ASSESSMENT METHODS IN TEACHING BIOLOGICAL
AND BIOORGANIC CHEMISTRY

ОГЛЯДИ

Міз А. В. (Тернопіль) ОТРУЄННЯ ТЕТРАХЛОР-
МЕТАНОМ: ПОШИРЕНІСТЬ, ПАТОГЕНЕЗ, КЛІНІЧНІ
ТА МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ПРОЯВИ

104

Miz A. V. (Ternopil) POISONING OF CARBON
TETRACHLORIDE: PREVALENCE, PATHOGENESIS,
CLINICAL AND MORPHOFUNCTIONAL
MANIFESTATIONS

Коваль О. С., Фтемова Л. В., Дробик Н. М.
(Тернопіль) БІОЛОГІЧНО АКТИВНІ РЕЧОВИНИ ВИДІВ
РОДУ *HYPERICUM* L.

110

Koval O. S., Ftemova L. V., Drobyk N. M. (Ternopil)
BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES OF
HYPERICUM L. GENUS

В. Г. Майданник¹, Є. А. Бурлака^{1, 2}, І. І. Ганусевич³
НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ О. О. БОГОМОЛЬЦЯ¹, КИЇВ
KAROLINSKA INSTITUTET², STOCKHOLM, SWEDEN
ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ І РАДІОБІОЛОГІЇ
ІМЕНІ Р. Є. КАВЕЦЬКОГО НАН УКРАЇНИ³, КИЇВ

МЕХАНІЗМИ ПРОГРЕСУВАННЯ ПОШКОДЖЕННЯ НИРОК ПРИ ХРОНІЧНОМУ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТІ У ДІТЕЙ

Досліджено механізми прогресування пошкодження нирок у 38 дітей з нефротичною формою хронічного гломерулонефриту (ХГН). Встановлено, що прогресування ХГН у дітей характеризується високим рівнем ремоделюючих процесів у структурах нирки, які реалізуються за рахунок активації матриксних металопротеїназ (ММП-2 та ММП-9). Показано, що рівні ММП-2 та ММП-9 залежать від ступеня порушення функції нирок. Виявлено високі рівні експресії про-апоптозного фактора Вах у тканинах нирок пацієнтів з фокально-сегментарним гломерулосклерозом. Ремодельовання та апоптоз при ХГН у дітей є складовими компонентами фіброзу, розвиток якого також супроводжується зниженням активності субодиниці транскрипційного фактора NF-κB (p65). Подальше вивчення показників, що характеризують рівень пошкодження нирок при ХГН у дітей, є перспективним напрямком для розробки додаткових патогенетично обґрунтованих терапевтичних підходів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: хронічний гломерулонефрит, прогресування, склерозування, апоптоз, ММП, NF-κB.

ВСТУП. Нирки є прикладом органа, що має здатність до розвитку процесів ремоделювання судин, фіброзу та склерозу навіть на ранніх стадіях розвитку захворювань, які перебігають хронічно. Судини нирок, у тому числі капіляри клубочків, висхідна і низхідна артеріоли, які зазнали змін за типом атеросклеротичних, згодом зазнають стенозу з наступним розвитком ішемії, що провокує та посилює фіброзування [20]. Паралельно з активацією аутоімунних пошкоджень нирок з участю імунних комплексів при хронічному гломерулонефриті (ХГН), одним із механізмів при розвитку фіброзування є активація клітинної ланки імунітету. При цьому відбуваються пошкодження тканин, інфільтрація стінки судин імунокомпетентними клітинами та активація фібробластів. Дані клітини продукують велику кількість гуморальних месенджерів, що беруть участь у розвитку запалення та запуску профібротичних сигнальних каскадів. Основними фіброзостимулювальними сигнальними факторами є радикальні форми кисню (РФК), ростові фактори, ангіотензин II [7, 19].

Особливості гістологічної будови нирок (значний розвиток мезангіального й інтерстиційного матриксу) та їх пошкодження є при-

чиною швидкого прогресування захворювань нирок, що хронічно перебігають, при яких мають місце гломерулосклероз та інтерстиційний фіброз.

Протеїнурія є причиною прогресування гломерулярних пошкоджень, виникнення та посилення тубулоінтерстиційних порушень, ініціатором ряду вторинних розладів, які викликають втрату функції нирок. Хронічне запалення, що лежить в основі патогенезу хронічних гломерулярних захворювань нирок, супроводжується процесами фіброзу та ремоделювання міжклітинного матриксу [6].

Матриксні металопротеїнази (ММП) складають велику родину цинкозалежних ендопептидаз, спільною властивістю яких є здатність протеолізувати компоненти позаклітинного матриксу [11, 16]. Широкий спектр субстратів ММП дозволяє їм відігравати важливу роль не тільки при ремоделюванні зовнішньоклітинного матриксу, а й у контролі багатьох функцій клітин, таких, як проліферація, міграція, диференціація, ангіогенез і апоптоз при захворюваннях нирок [9]. Вивчення молекулярних процесів, що лежать в основі порушення функції нирок, розвитку фіброзу та склерозу при ХГН, вимагає додаткового дослідження з метою розробки нових підходів до лікування.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дизайн дослідження – одномоментне (cross-sectional study), об'єкт – 47 пацієнтів (віком від 5 до 18 років) з активною стадією нефротичної форми ХГН, які перебували на стаціонарному лікуванні в клініці дитячої нефрології ДУ “Інститут нефрології АМН України” (клінічна база – ДКЛ № 7 м. Києва) в 2008–2011 рр. Стан КФ було оцінено з використанням стандартної формули Шварца в мл/хв/1,73 м².

Залежно від стану функції нирок хворих поділили на групи: ХЗН I (швидкість КФ ≥ 90 мл/хв/1,73 м²) – n=25, ХЗН II–III (швидкість КФ 30–89 мл/хв/1,73 м²) – n=13. Пацієнтів зі швидкістю КФ < 30 мл/хв/1,73 м² було виключено з дослідження. Групу контролю склали 19 умовно здорових дітей.

Комплекс обстеження, крім загальноприйнятих методик (огляд, моніторинг артеріального тиску, загальний та біохімічний аналізи крові, визначення добової протеїнурії, вивчення сечового осаду та концентраційної спроможності нирок, УЗД органів черевної порожнини тощо), включав визначення показників у крові хворих, які є маркерами ремоделюючих процесів, хронічного запалення, апоптозу.

Концентрації латентних та активних форм ММП-2 і ММП-9 в сироватці крові пацієнтів визначали методом зимографії у 12 % поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію і 0,1 % желатину в ролі субстрату. Після відмивання гелю протеолітична активність ММП візуалізувалась у вигляді знебарвлених смужок на синьому тлі, а їх локалізація відповідала молекулярній масі кожного з ферментів, які визначались за стандартами молекулярної маси [5]. Протеолітичну активність оцінювали шляхом вимірювання площі зони лізису, використовуючи для порівняння стандартний набір ММП-2 і ММП-9. Результати аналізували за допомогою стандартної програми.

Рівні транскрипційного фактора NF- κ B визначали з використанням методу Western Blotting. Для підготовки зразків плазму та суспензію нейтрофілів хворих розводили в буфері (50 mM Tris/HCl (pH 7,4), 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 mM дитіотреїтол, 0,5 % деоксихлорат натрію, 1,5 % NP-40, 1 mM фенілметилсульфонілу флюорит) у співвідношенні 1:100. До зразка додавали інгібітори протеаз (Protease cocktail inhibitor, Roche Diagnostics, USA) у співвідношенні 1:1000 до кінцевого об'єму. Розрахунок об'єму зразків при внесенні в гель для електрофорезу виконано з урахуванням концентрації загального білка плазми обстежених та суспензії клітин за методом Бредфорда (Bio-Rad protein assay, США).

Електрофорез зразків проводили в 12,5 % поліакриламідному гелі з наступним трансфером на полівінілден-дифлюоридні мембрани та блокуванням мембран у 5 % знежиреному молоці на TBS-T (136 mM NaCl, 10 mM Tris, 0,05 % Tween 20). Інкубацію з первинними антитілами (Rabbit anti-NF- κ B, Santa Cruz, USA) у співвідношенні 1:1000 проводили протягом 12 год при температурі 4 °C. Як вторинні антитіла використовували Anti-rabbit horseshoe peroxidase Ab (GE Healthcare) в концентрації 1:3000 з інкубуванням протягом 1 год при кімнатній температурі. Після відмивання мембран за допомогою TBS-T проведено візуалізацію білків із застосуванням хемілюмінесцентного субстрату ECL (GE Healthcare). Для контролю об'єму зразків, внесених у гель при електрофорезі, використано β -актин.

Імуногістохімічне визначення експресії факторів системи контролю апоптозу (Bax) проводили на біотичному матеріалі дітей з морфологічною формою хронічного гломерулонефриту – фокальним сегментарним гломерулосклерозом. Зрізи тканини нирок були відмиті від парафіну, дегідратовані. Як первинні антитіла використовували поліклональні анти-Bax (розведення 1:100) (Cell Signaling, USA) антитіла. У ролі вторинних флуоресцеїновмісних антитіл застосовували Alexa 488 (Invitrogen, USA, розведення 1:500). Ядра клітин візуалізувались за допомогою 4,6-діаміно-2-феніліндолу (DAPI, 1,5 мг/мл), який додавали з фосфатним буфером при останньому відмиванні зрізів. Перед мікроскопією скельця зі зрізами покривали Immu-Mount (Thermo Shandon, Midland, Canada). Знімки зроблено за допомогою скануючого лазерного конфокального мікроскопа з використанням $\times 20/1.4$ Н.А. об'єктива.

Матеріал опрацьовано із застосуванням методів варіаційної статистики (STATISTICA 6.0) та непараметричних статистичних підходів (Mann-Whitney U test). Результати представлено як Mean $\pm$ SEM, статистично достовірним вважали рівень $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Дослідження рівня ремоделюючих процесів у структурах нирок дітей з ХГН виявило значне підвищення рівнів активних форм ММП-2 та ММП-9 у сироватці крові всіх дітей порівняно з групою контролю. При цьому рівень активності ММП залежав від наявності порушення функції нирок. Так, при зниженні функції нирок (ХЗН II–III ст.) рівень активної ММП-2 значно перевищував цей показник у групі дітей зі збереженою функцією нирок (ХЗН I ст.) ($p < 0,001$) (рис. 1, А). Аналогічну тенденцію виявлено при

аналізі рівнів активної ММП-9 (рис. 1, Б). При цьому як у групі пацієнтів без порушення функції нирок, так і у хворих з порушенням функції нирок рівень активності ММП-9 був вищим за рівень ММП-2 ($p < 0,01$) (рис. 1, А, Б).

Дослідження рівня активності транскрипційного фактора NF- κ B (його субодиниці p65), що має антиапоптозний вплив, при ХГН у дітей виявило значне зниження його експресії у всіх обстежених пацієнтів. При цьому ступінь інгібування залежав від наявності порушення функції нирок. Так, при збереженій функції (ХЗН I ст.) експресія NF- κ B була знижена на $(15,2 \pm 5,9) \%$ порівняно з контролем. При зниженні КФ (ХЗН II–III ст.) спостерігалось зменшення активності NF- κ B на $(20,6 \pm 6,4) \%$ ($p < 0,01$ та $p < 0,001$ відповідно порівняно з групою контролю). При цьому під час порівняння активності NF- κ B між двома групами пацієнтів з ХГН достовірної різниці не виявлено (рис. 2).

Аналіз рівня експресії про-апоптозного фактора Вах апоптозу в зрізах біопсійного матеріалу нирок дітей з морфологічною формою хронічного гломерулонефриту – фокально-сегментарним гломерулосклерозом з ознаками запалення виявив наявність високого рівня експресії Вах як у клубочку, так і в

тубулоінтерстиційному сегменті. При цьому вищий рівень імуносигналу було зафіксовано в клубочках з рівнем склерозу II–III ст. (рис. 3, А). При повному склерозуванні клубочка високий рівень експресії Вах локалізувався в тубулоінтерстиційному сегменті (рис. 3, Б).

Особливості гістологічної будови нирок (значний розвиток мезангіального й інтерстиційного матриксу) та їх пошкодження є причиною швидкого прогресування захворювань нирок, що хронічно перебігають, при яких мають місце гломерулосклероз та інтерстиційний фіброз. Мезангіальні клітини – основні продуценти гломерулярного зовнішньоклітинного матриксу, таким чином, вони беруть безпосередню участь у підтримці структурно-функціонального стану клубочка [3]. Основну роль при гломерулосклерозі відіграє як зростання синтезу колагену, в тому числі I, III та IV типів, так і його ремоделювання. При фіброзуванні нирки відмічають неадекватний синтез компонентів зовнішньоклітинного матриксу [2, 3]. При цьому знижується активність протеаз, що деградують матрикс, і зростає активність ферментів, які посилюють його акумулювання та ремоделювання, – матриксних металопротеїназ [2, 3, 10]. ММП беруть участь у деградації компонентів зовнішньоклітинного матриксу – колагену, ламініну, фібронектину, протеогліканів та нематриксних субстратів. ММП секретиються в неактивному латентному стані й активуються під впливом плазматичних протеїніназ. Хронічне запалення асоціюється з

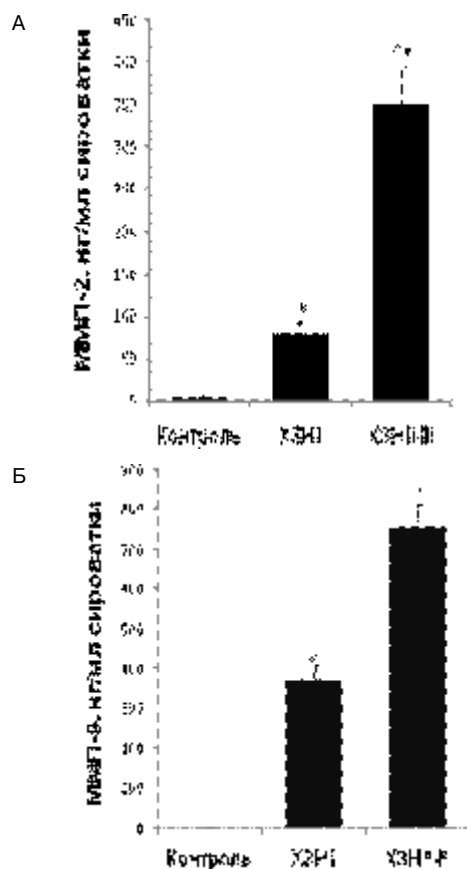


Рис. 1. Рівні ММП-2 та ММП-9 в сироватці крові дітей з ХГН.

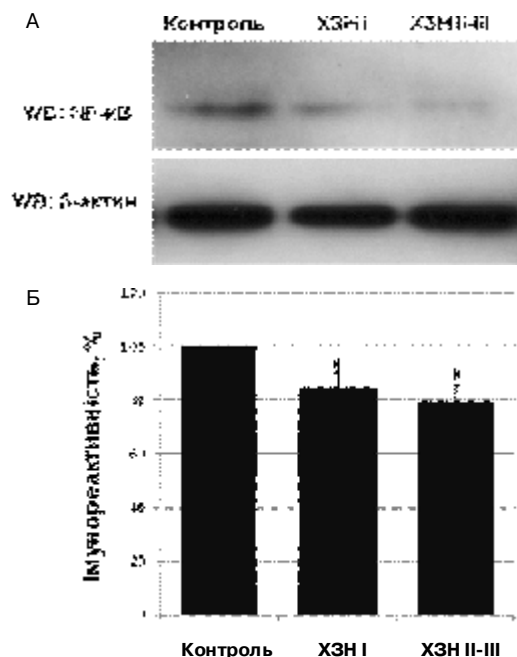


Рис. 2. Рівні активності NF- κ B у дітей з ХГН: А – рівні NF- κ B; Б – імунореактивність; * – $p < 0,05$.

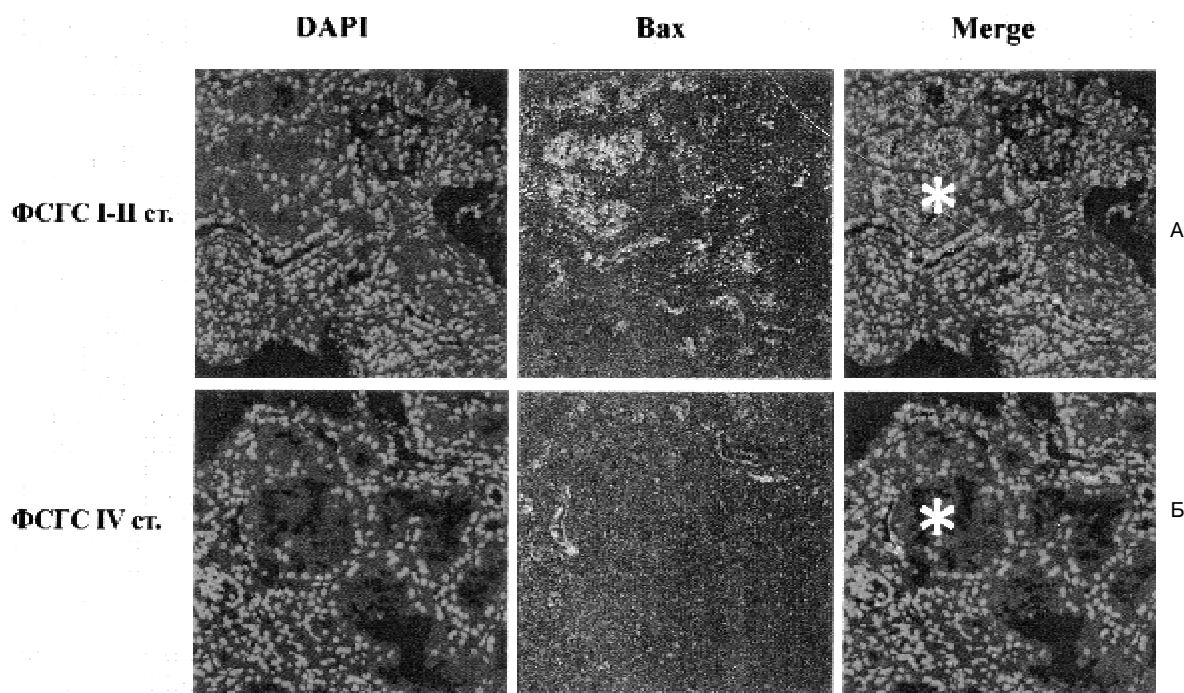


Рис. 3. Топічна локалізація експресії про-апоптозного фактора Вах при різних ступенях ФСТС: DAPI – візуалізація ядер; Вах – імуносигнал Вах у тканині нирки; Merge – сумісне зображення; * – клубочок.

активацією 9-ї ізоформи ММП – ММП-9, що є однією з найбільш експресованих у нирці та судинах. Підвищена секреція ММП-9 викликає розвиток процесів фіброзу в нирці та ремоделювання ниркових судин [8, 12, 13].

Крім ММП, важливу роль у ремоделюванні судин та позаклітинного матриксу відіграє апоптоз. Так, протеїнурія при гломерулярних захворюваннях нирок сприяє не лише прогресуванню гломерулярних порушень, а і виникненню тубулоінтерстиційних пошкоджень. Одним із механізмів пошкоджувального впливу протеїнурії є надмірна реабсорбція білків клітинами проксимальних канальців, що може призвести до їх пошкодження і загибелі [17, 19, 20]. У відповідь на надмірну лізосомальну деградацію білків, присутніх в ультрафільтраті, проксимальнотубулярні клітини виробляють різні прозапальні й профібротичні молекули [14, 17]. Такі фактори, як інтерлейкін-8 (IL-8) [22], фактор некрозу пухлини- α (ФНП- α), ендотелін, TGF- β і колаген [4, 21], сприяють розвитку проліферативних процесів, фіброзу.

Початок інтерстиційного фіброзу характеризується інфільтрацією інтерстицію запальними клітинами, в основному макрофагами і Т-клітинами, які викликають активацію фібробластів. При цьому також зростає активність матриксних металопротеїназ, що сприяє ремоделюванню колагену I, III і IV, ламініну і фібронектину [15]. Отримані нами дані стосовно

високих рівнів ММП-2 та ММП-9 при ХГН у дітей з порушенням функції нирок вказують на те, що активація ММП при цьому має персистентний характер.

Високі концентрації білка в ультрафільтраті при ХГН викликають апоптоз проксимальнотубулярних клітин [4, 20]. Апоптоз при цьому є результатом запально-асоційованих процесів та активаційного впливу ММП [1, 18]. Отримані нами дані свідчать про те, що активація апоптозу при ХГН відбувається як з участю про-апоптозного фактора Вах, так і за рахунок зниження експресії субодиниці транскрипційного фактора NF- κ B (p65). Активованій у проксимальнотубулярних клітинах апоптоз призводить до тубулярної атрофії, виникнення атубулярних клубочків. Наявність атубулярних клубочків визначає, з одного боку, стан зміни функції нирок, а з іншого – прогресування тубулоінтерстиційних пошкоджень.

Таким чином, фіброз нирок при ХГН пов'язаний зі збільшенням синтезу компонентів і ремоделюванням позаклітинного матриксу, апоптозом, що є результатом запально-потенційованої активації ММП, зниження активності антиапоптозної субодиниці транскрипційного фактора NF- κ B. Кінцеві результати описаних порушень – гломерулярний склероз, тубулоінтерстиційний фіброз, виникнення атубулярних клубочків, що призводить до втрати функції нирок.

ВИСНОВКИ. 1. Пошкодження нирок при ХГН у дітей пов'язане з активацією ремоделюючих процесів у структурах нирки під впливом ММП.

2. Ремоделювання тканин нирок при ХГН супроводжується активацією вторинних патофізіологічних процесів, зокрема апоптозу, про що свідчать високі рівні про-апоптозного фактора Вах.

3. Ремоделювання та апоптоз при ХГН у дітей є складовими компонентами фіброзу,

розвиток якого також супроводжується зниженням активності субодиниці транскрипційного фактора NF-κB (p65), що має антиапоптозний вплив.

4. Подальше вивчення досліджених показників може бути використане для оцінки активності процесів пошкодження нирок при ХГН (ремоделювання, апоптозу, антиапоптозного захисту) в структурах нирки, визначення додаткових патогенетично обґрунтованих терапевтичних засобів впливу на патологічний процес.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Albumin stimulates interleukin-8 expression in proximal tubular epithelial cells in vitro and in vivo / S. Tang, J. C. Leung, K. Abe [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2003. – **111**. – P. 515–527.
2. Altered apoptosis of inflammatory neutrophils in MMP-9-deficient mice is due to lower expression and activity of caspase-3 / E. Kolaczowska, A. Kozioł, B. Plytycz [et al.] // *Immunol. Lett.* – 2009. – **126**. – P. 73–82.
3. A self propagating matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) dependent cycle of chronic neutrophilic inflammation / X. Xu, P. L. Jackson, S. Tanner [et al.] // *PLoS One*. – 2011. – **6**. – P. 1578.
4. Benigni A. How renal cytokines and growth factors contribute to renal disease progression / A. Benigni, G. Remuzzi // *Am. J. Kidney Dis.* – 2001. – **37**. – P. 21–24.
5. Borza C. M. The role of cell-extracellular matrix interactions in glomerular injury / C. M. Borza, A. Pozzi // *Exp. Cell Res.* – 2012. – **318**(9). – P. 1001–1010.
6. Catania J. M. Role of matrix metalloproteinases in renal pathophysiologies / J. M. Catania, G. Chen, A. R. Parrish // *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* – 2007. – **292**. – P. 905–911.
7. Eddy A. A. Renal expression of genes that promote interstitial inflammation and fibrosis in rats with protein-overload proteinuria / A. A. Eddy, C. M. Giachelli // *Kidney Int.* – 1995. – **47**. – P. 1546–1557.
8. Inhibition of apoptosis in rat mesangial cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 / H. Lin, X. Chen, J. Wang [et al.] // *Kidney Int.* – 2002. – **62**. – P. 60–69.
9. Inhibition of Invasion and metastasis in cells transfected with an inhibitor of metalloproteinases / Y. A. De Clerck, N. Perez, H. Shimada [et al.] // *Cancer Research*. – 1992. – **52**. – P. 701–708.
10. Matrix metalloproteinase deficiency in mice exacerbates inflammatory arthritis through delayed neutrophil apoptosis and reduced caspase 11 expression / J. H. Cox, A. E. Starr, R. Kappelhoff [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2010. – **62**. – P. 3645–3655.
11. Matrix metalloproteinase proteomics: 651 substrates, targets, and therapy / C. J. Morrison, G. S. Butler, D. Rodriguez, C. M. Overall // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2009. – **21**. – P. 645–653.
12. Matrix metalloproteinase 2 and basement membrane integrity: a unifying mechanism for progressive renal injury / S. Cheng, A. S. Pollock, R. Mahimkar [et al.] // *FASEB J.* – 2006. – **20**. – P. 1898–480.
13. Matrix metalloproteinase-9 induces transforming growth factor-beta(1) production in airway epithelium via activation of epidermal growth factor receptors / D. W. Perng, K. T. Chang, K. C. Su [et al.] // *Life Sci.* – 2011. – **89**. – P. 204–212.
14. Oxidants in chronic kidney disease / S. V. Shah, R. Baliga, M. Rajapurkar, V. A. Fonseca // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2007. – **18**. – P. 16–28.
15. Pardo A. Matrix metalloproteinases in aberrant fibrotic tissue remodeling / A. Pardo, M. Selman // *Proc. Am. Thoracic. Soc.* – 2006. – **3**. – P. 383–388.
16. Parks W. C. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity / W. C. Parks, C. L. Wilson, Y. S. Lopez-Boado // *Nat. Rev. Immunol.* – 2004. – **4**. – P. 617–629.
17. Protein overload-induced NF-kappaB activation in proximal tubular cells requires H(2)O(2) through a PKC-dependent pathway / M. Morigi, D. Macconi, C. Zoja [et al.] // *J Am Soc Nephrol.* – 2002. – **13**. – P. 1179–1189.
18. Protein uptake disturbs collagen homeostasis in proximal tubule-derived cells / V. Wohlfarth, K. Drumm, S. Mildenberger [et al.] // *Kidney Int. Suppl.* – 2003. – P. 103–109.
19. Proteinuria and the risk of developing end-stage renal disease / K. Iseki, Y. Ikemiya, C. Iseki, S. Takishita // *Kidney Int.* – 2003. – **63**. – P. 1468–1474.
20. Remuzzi G. Pathophysiology of progressive nephropathies / G. Remuzzi, T. Bertani // *N. Engl. J. Med.* – 1998. – **339**. – P. 1448–1456.
21. Secretion of chemokines and cytokines by human tubular epithelial cells in response to proteins / C. J. Burton, C. Combe, J. Walls [et al.] // *Nephrol. Dial. Transplant.* – 1999. – **14**. – P. 2628–2633.
22. Transforming growth factor-beta1 is up-regulated by podocytes in response to excess intraglomerular passage of proteins: a central pathway in progressive glomerulosclerosis / M. Abbate, C. Zoja, M. Morigi [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 2002. – **161**. – P. 2179–2193.

В. Г. Майданник¹, Е. А. Бурлака^{1,2}, И. И. Ганусевич³
НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ А. А. БОГОМОЛЬЦА¹, КИЕВ
KAROLINSKA INSTITUTET², STOCKHOLM, SWEDEN
ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИИ, ОНКОЛОГИИ И РАДИОБИОЛОГИИ
ИМЕНИ Р. Е. КАВЕЦКОГО НАН УКРАИНЫ³, КИЕВ

МЕХАНИЗМЫ ПРОГРЕССИРОВАНИЯ ПОВРЕЖДЕНИЯ ПОЧЕК ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТЕ У ДЕТЕЙ

Резюме

Исследованы механизмы прогрессирования повреждения почек у 38 детей с нефротической формой хронического гломерулонефрита (ХГН). Установлено, что прогрессирование ХГН у детей характеризуется высоким уровнем ремоделирующих процессов в структурах почки, которые реализуются за счет активации матриксных металлопротеиназ (ММП-2 и ММП-9). Показано, что уровни ММП-2 и ММП-9 зависят от степени нарушения функции почек. Выявлены высокие уровни экспрессии про-апоптотического фактора Bax в тканях почек пациентов с фокально-сегментарным гломерулосклерозом. Ремоделирование и апоптоз при ХГН у детей являются составляющими компонентами фиброза, развитие которого также сопровождается снижением активности субъединицы транскрипционного фактора NF-κB (p65). Дальнейшее изучение показателей, характеризующих повреждение почек при ХГН у детей, является перспективным направлением для разработки дополнительных патогенетически обоснованных терапевтических подходов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: хронический гломерулонефрит, прогрессирование, склерозирование, апоптоз, ММП, NF-κB.

V. H. Maidannyk¹, Ye. A. Burlaka^{1,2}, I. I. Hanusevych³
O. O. BOHOMOLET'S NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY¹, KYIV
KAROLINSKA INSTITUTET², STOCKHOLM, SWEDEN
R. YE. KAVETSKYI INSTITUTE OF EXPERIMENTAL PATHOLOGY, ONCOLOGY AND RADIOBIOLOGY³, KYIV

MECHANISMS OF THE KIDNEY DAMAGES PROGRESSION IN CHRONIC GLOMERULONEPHRITIS IN CHILDREN

Summary

The mechanisms of progression of kidney damage in 38 children with nephrotic type of chronic glomerulonephritis (CG) were studied. We found that the progression of chronic glomerulonephritis in children characterized by high level of remodeling processes in the kidney structures, which are realized through activation of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9). It was shown that levels of MMP-2 and MMP-9 depend on the degree of renal dysfunction. There were revealed high levels of pro-apoptotic factor Bax expression in renal tissues of patients with focal segmental glomerulosclerosis. Remodeling and apoptosis in chronic glomerulonephritis in children are the main components of the fibrosis development and are accompanied by decreased activity of p65 subunit of the transcription factor NF-κB. Further study of indicators of kidney damage in children with chronic glomerulonephritis is a promising direction for the development of pathogenesis-based therapeutic approaches.

KEY WORDS: chronic glomerulonephritis, progression, sclerosis, apoptosis, MMP, NF-κB.

Отримано 30.07.12

Адреса для листування: Е. А. Бурлака, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, бульвар Шевченка, 13, Київ, 01601, Україна, e-mail: evgenja.burlaka@rambler.ru.

А. П. Бурлака¹, О. Б. Кучменко², Д. М. Петухов², І. І. Ганусевич¹, С. М. Лукін¹,
 Є. В. Лук'янчук¹, Є. П. Сидорик¹, Н. В. Делеменчук², Г. В. Донченко²
 ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ І РАДІОБІОЛОГІЇ
 ІМЕНІ Р. Є. КАВЕЦЬКОГО НАН УКРАЇНИ¹, КИЇВ
 ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМЕНІ О. В. ПАЛЛАДІНА НАН УКРАЇНИ², КИЇВ

ВПЛИВ КОМПЛЕКСУ ПОПЕРЕДНИКІВ І МОДУЛЯТОРА БІОСИНТЕЗУ УБІХІНОНУ НА СИСТЕМУ ЦЕРУЛОПЛАЗМІН/ТРАНСФЕРИН, ВІЛЬНОРАДИ- КАЛЬНЕ ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ І БІЛКІВ ТА АКТИВНІСТЬ МАТРИКСНИХ МЕТАЛОПРОТЕЇНАЗ У КРОВІ ТВАРИН ЗА ВВЕДЕННЯ ДОКСОРУБІЦИНУ

Важливою складовою токсичного ефекту доксорубіцину є активація вільнорадикальних процесів окиснення ліпідів і білків та зростання активності матриксних металопротеїназ (ММП), що може спричиняти посилення деструкції міжклітинного матриксу. При цьому спостерігається зниження вмісту церулоплазміну (ЦП) та трансферину (ТФ) в крові тварин. Застосування доксорубіцину разом із комплексом ЕПМ і препаратом CoQ_{10} порівняно з його самотійним використанням, спричиняє зниження вмісту продуктів пероксидного окиснення ліпідів, карбонільних продуктів окиснення білків, активності ММП-2 та ММП-9, підвищення рівня ЦП і співвідношення ЦП/ТФ у крові, що свідчить про нормалізацію антиоксидантного статусу в крові тварин та зменшення токсичного впливу доксорубіцину.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **убіхінон, матриксні металопротеїнази, церулоплазмін, трансферин.**

ВСТУП. Доксорубіцин (Д) є антибіотиком антрациклінового ряду, який широко використовують як антинеопластичний агент. Проте його протипухлинний ефект прямо корелює з дозозалежним проявом токсичності відносно печінки, серця та інших органів [2]. Основну роль у реалізації токсичності доксорубіцину відіграє зростання рівнів активних форм кисню (АФК), яке, у свою чергу, спричиняє ряд токсичних ефектів, включно з активацією матриксних металопротеїназ (ММП) – ферментів протеолізу міжклітинного матриксу [15].

Окиснення Fe^{2+} до Fe^{3+} каталізується церулоплазміном (ЦП), білком з ферооксидазною активністю, що робить можливим включення заліза в трансферин (ТФ) без утворення токсичних продуктів [1].

Показано, що при застосуванні антиоксидантів може спостерігатися підвищення антинеопластичної активності доксорубіцину за рахунок зменшення рівнів АФК, що продукуються мітохондріями [2, 19]. Деякі хелатори заліза можуть бути більш ефективними, порівняно з антиоксидантами, в попередженні розвитку кардіотоксичності [17].

Убіхінон (CoQ) відіграє важливу роль у механізмах функціонування клітини як компонент ланцюга транспорту електронів у міто-

хондріях, антиоксидант, регулятор процесів генної експресії, сигнальної трансдукції, апоптозу тощо [14]. При порушенні процесів біосинтезу CoQ його кількість, що надходить з їжею, не може повністю забезпечити фізіологічні потреби організму ссавців, особливо за умов розвитку чи наявності патологій, що пов'язані з порушенням біоенергетичного обміну організму [3, 14]. Отже, для забезпечення потреб організму в CoQ необхідне додаткове надходження його ззовні у вигляді лікувальних препаратів. Проте лікувальний курс має високу вартість; після його закінчення не спостерігається відновлення та активації ферментних систем ендogenous біосинтезу CoQ [14].

В наших попередніх дослідженнях продемонстровано захисний ефект комплексу попередників і модулаторів біосинтезу CoQ на мітохондрії клітин печінки і серця, про що свідчать відновлення транспорту електронів у дихальному ланцюзі, нормалізація активності комплексів I, II і IV та зменшення активності ММП-2 та ММП-9 [5, 7]. Досліджуваний комплекс є мітохондріальнотропним та здатен відновлювати транспорт електронів у дихальному ланцюзі мітохондрій, пошкоджених доксорубіцином, і таким чином нівелює його токсичну дію на тканини організму.

Метою даної роботи було дослідити рівні Fe^{3+} -ТФ, Cu^{2+} -ЦП, продуктів вільнорадикального окиснення ліпідів і білків та активності

ММП у крові щурів за умов введення доксорубіцину та дії препарату CoQ_{10} , комплексу попередників і модуляторів біосинтезу CoQ .

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. В досліджах використовували щурів-самців масою 180–220 г. Тварин було поділено на 4 групи: 1-ша група – контрольні (інтактні) тварини; 2-га – тварини, яким вводили доксорубіцин; 3-тя – тварини, яким на фоні введення доксорубіцину вводили α -токоферолацетат, 4-гідроксibenзойну кислоту і метіонін (комплекс ЕПМ); 4-та – тварини, яким на фоні введення доксорубіцину вводили препарат CoQ_{10} (“Кудесан” ЗАТ Аквіон, Російська Федерація).

Доксорубіцин (ВАТ “Київмедпрепарат”, Україна) вводили внутрішньочеревно в дозі 2,2 мг/кг маси тіла щоденно протягом 8 діб [16]. Контрольна група щурів отримувала фізіологічний розчин хлориду натрію в такому ж об’ємі. Біологічно активні сполуки (ЕПМ та CoQ_{10}) тварини одержували перорально протягом 8 діб паралельно із введенням доксорубіцину [6]. Щурів декапітували з урахуванням вимог Міжнародної конвенції з правил гуманного поводження з дослідними тваринами.

Зразки крові збирали в пробірки з цитратом натрію, які надалі заморожували в рідкому азоті в спеціальних прес-формах. Реєстрацію рівнів ЦП і ТФ проводили на спектрометрі ЕПР при температурі рідкого азоту 77°K [12].

Вміст дієнових кон’югатів (ДК), ТБК-позитивних продуктів (ТБКПП) і карбонільних продуктів окиснення білків (КПОБ) у сироватці крові визначали спектрофотометрично методами [4, 8, 9].

Концентрації активних форм ММП-2 і ММП-9 оцінювали методом зимографії в 12 % поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію та 0,1 % желатином як субстратом [11]. Оцінку протеолітичної активності проводили шляхом вимірювання розмірів зони лізису, використовуючи тест-системи для ММП-2 і ММП-9 (“Sigma”, США). Результати оброблено із застосуванням стандартної програми “TotalLab1.01”.

Результати роботи оброблено за допомогою методів варіаційної статистики. Числові дані

наведено у формі середньої величини із стандартною помилкою ($M \pm m$). Достовірність різниці двох середніх величин оцінювали за критерієм Стюдента (t).

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Показано, що при введенні тваринам доксорубіцину спостерігалось достовірне зростання в сироватці крові вмісту ДК, ТБКПП і КПОБ порівняно з контролем (табл.).

За умов введення тваринам комплексу ЕПМ і препарату CoQ_{10} зменшувався вміст ДК і ТБКПП; при цьому вміст КПОБ залишався вищим за контрольні величини (табл.).

Вміст активних форм ММП-2 та ММП-9 в сироватці крові тварин під дією доксорубіцину підвищувався, порівняно з контрольними значеннями, у 10–20 разів, що свідчить про його загальний токсичний вплив на стан міжклітинного матриксу. При введенні разом із доксорубіцином комплексу ЕПМ та CoQ_{10} активність ММП у сироватці крові щурів зменшувалась в 3–4 рази порівняно з тваринами, яким вводили тільки доксорубіцин (рис. 1).

Мітохондріальна дисфункція, спричинена доксорубіцином через редоксзалежні регуляторні механізми [17], призводила до підвищення рівня синтезу та активації ММП і, таким чином, до посилення деструкції позаклітинного матриксу. За умов застосування антиоксидантів (наприклад вітаміну Е, убіхінону) спостерігалось зменшення рівнів АФК, продукованих мітохондріями [19], в результаті чого знижувалась активність ММП у тканинах [5, 7] і, як наслідок, у крові тварин.

Показники антиоксидантного статусу крові – ЦП та ЦП/ТФ у результаті введення тваринам доксорубіцину знижувались (рис. 2).

Антиоксидантна активність ЦП пропорційна концентрації Cu^{2+} -ЦП. Антиоксидантною активністю володіє також молекула апоТФ. У міру насичення апоТФ залізом вона знижується. За фізіологічних концентрацій ЦП і апоТФ кожен із них інгібує ПОЛ приблизно на 50 %. Отже, співвідношення ЦП/ТФ є показником сумарної антиоксидантної активності цих білків. Таким чином, антиоксидантна система ЦП/ТФ є пер-

Таблиця – Вміст ДК, ТБКПП і КПОБ (ум. од./мл) у сироватці крові тварин за умов введення доксорубіцину та дії біологічно активних сполук ($M \pm m$, $n=6$)

Група тварин	ДК	ТБКПП	КПОБ
Контроль	$0,25 \pm 0,018$	$11,93 \pm 0,94$	$4,40 \pm 0,32$
Д	$0,33 \pm 0,029^*$	$17,33 \pm 1,68^*$	$11,23 \pm 0,98^*$
Д+ЕПМ	$0,07 \pm 0,006^{\#}$	$11,97 \pm 1,87^{\#}$	$9,77 \pm 0,75$
Д+ CoQ_{10}	$0,13 \pm 0,017^{\#}$	$10,90 \pm 3,1^{\#}$	$9,83 \pm 1,35^*$

Примітка. * – різниця достовірна порівняно з контролем; # – різниця достовірна порівняно з групою тварин, які отримували доксорубіцин ($p < 0,05$).

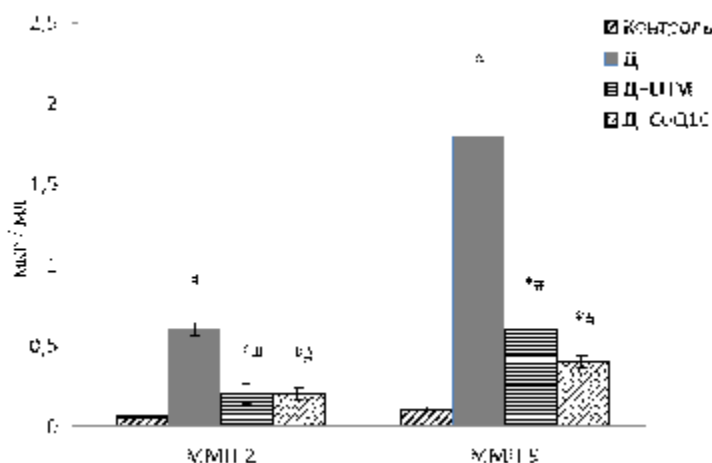


Рис. 1. Активність ММП-2 та ММП-9 (концентрація активної форми ферменту) в сироватці крові тварин за умов введення доксорубіцину та дії біологічно активних сполук ($M \pm m$, $n=6$): * – різниця достовірна порівняно з контролем; # – різниця достовірна порівняно з групою тварин, які отримували доксорубіцин ($p < 0,05$).

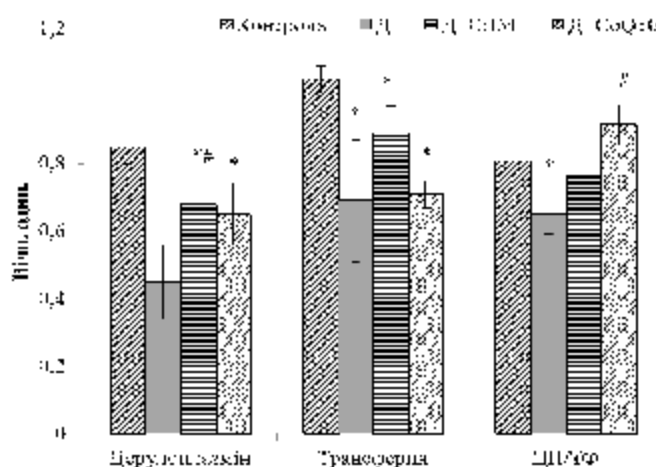


Рис. 2. Вміст ЦП і ТФ у крові тварин за умов введення доксорубіцину та дії біологічно активних сполук ($M \pm m$, $n=6$): * – різниця достовірна порівняно з контролем; # – різниця достовірна порівняно з групою тварин, які отримували доксорубіцин ($p < 0,05$).

шою лінією антиоксидантного захисту організму, а відповідний показник – одним із важливих показників антиоксидантного статусу крові [1].

Зменшення Fe^{3+} -ТФ, що має місце за умов введення щурам доксорубіцину, свідчить про те, що у крові цих тварин зростає рівень ненасиченого ТФ, який може зв'язувати Fe^{3+} . Проте контрольоване окиснення Fe^{2+} до Fe^{3+} потребує фероксидазної активності ЦП. Оскільки рівень Cu^{2+} -ЦП теж знижується, в крові цих тварин може зростати рівень Fe^{2+} .

Відомо, що зниження рівня Fe^{3+} -ТФ та Cu^{2+} -ЦП спостерігається у пацієнтів з онкологічними захворюваннями [10, 17], патологіями серцево-судинної системи [1]. При застосуванні доксорубіцину спостерігається аналогічна ситуація як *in vivo*, так і *in vitro* [17].

За умов введення тваринам комплексу ЕПМ відбувалося підвищення рівня ЦП і ТФ, а також співвідношення ЦП/ТФ (рис. 2). При введенні препарату CoQ_{10} вміст ЦП збільшу-

вався, рівень ТФ залишався на рівні щурів, які отримували доксорубіцин, співвідношення ЦП/ТФ зростало (рис. 2). Очевидно, дефіцит CoQ_{10} , що виникав за введення доксорубіцину, сприяв зменшенню захисту клітинних мембран від окиснення. При цьому інтенсифікувалися процеси ПОЛ, а оскільки ЦП елімінує супероксидний аніон-радикал і попереджує автоокиснення ліпідів у мембранах клітин, має супероксиддисмутази, пероксидази, ферооксидази і амінооксидази активність, вміст його в крові знижувався. В літературі зустрічаються поодинокі відомості про вплив CoQ_{10} на вміст ЦП і ТФ. Зокрема, застосування препарату CoQ_{10} у хворих на ішемічну хворобу серця разом із традиційною кардіальною терапією сприяло зменшенню вмісту продуктів ПОЛ, зростанню вмісту ЦП у плазмі крові та співвідношення ЦП/ТФ [1].

Відмітимо, що рівні активності ММП-2 та ММП-9 в сироватці крові піддослідних тварин зворотно корелювали з показниками вмісту

ЦП (рис. 1, 2). Зниженню вмісту ЦП за умов введення доксорубіцину відповідало зростання концентрацій активних форм ММП, а за умов введення доксорубіцину разом з ЕПМ або CoQ_{10} спостерігалися збільшення вмісту ЦП та зменшення активності ММП. З одного боку, така залежність є наслідком відповідних взаємодій як між АФК і ЦП, так і між АФК і ММП, з іншого – ЦП може безпосередньо впливати на активність ММП, утворюючи з ними білкові комплекси [13, 18].

ВИСНОВКИ. Застосування доксорубіцину разом із комплексом ЕПМ і препаратом CoQ_{10} , порівняно з його самостійним використанням,

спричиняє зниження вмісту продуктів ПОЛ, карбонільних продуктів окиснення білків, активності ММП-2 та ММП-9, підвищення рівня ЦП і співвідношення ЦП/ТФ у крові, що свідчить про нормалізацію антиоксидантного статусу в крові тварин та зменшення токсичного впливу доксорубіцину. Ефекти від застосування комплексу ЕПМ та препарату CoQ_{10} за більшістю показників, які вивчали, є подібними. При цьому можна припустити, що регуляція стану ММП та ЦП і ТФ, яку продемонстровано в результаті проведених досліджень, може відбуватися внаслідок або прямої дії CoQ , або опосередковано через регуляцію ним редокс-статусу клітини.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Белая О. Л. Изучение активности антиоксидантной системы церулоплазмин-трансферрин в плазме крови больных ишемической болезнью сердца со стабильной стенокардией II и III функциональных классов методом электронного парамагнитного резонанса / О. Л. Белая, Л. М. Байдер, З. В. Куроптева // *Вопр. биол. мед. и фармац. хим.* – 2006. – № 4. – С. 46–49.
2. Ватулин М. Т. Антрациклиновая кардиомиопатия / М. Т. Ватулин, Н. В. Калинин, Е. В. Кетинг. – Донецк : ДонДІШІ, 2001. – 236 с.
3. Донченко Г. В. Биохимия убихинона (Q) / Г. В. Донченко. – К. : Наук. думка, 1988. – 240 с.
4. Дубинина Е. Е. Окислительная модификация белков крови человека: метод определения / Е. Е. Дубинина, С. О. Бурмистров, Д. А. Ходов // *Вопр. мед. химии.* – 1995. – **41**. – С. 24–26.
5. Модифікуюча (профілактична) дія убихінону та комплексу попередників і модулятора його біосинтезу на мітохондрії тканин печінки та серця за введення доксорубіцину / А. П. Бурлака, О. Б. Кучменко, Д. М. Петухов [та ін.] // *Онкологія.* – 2011. – № 4. – С. 300–303.
6. Пат. 82639 Україна, А61К31/355. Комплексний препарат для підвищення внутрішньоклітинного енергетичного обміну в організмі / Донченко Г. В., Кузьменко І. В., Кучменко О. Б., Петухов Д. М. – Заявл. 26.09.06 ; опубл. 25.04.08, Бюл. № 8.
7. Протекторний вплив активації біосинтезу убихінону на функціонування ланцюгу транспорту електронів мітохондрій клітин органів щурів за введення доксорубіцину / А. П. Бурлака, О. Б. Кучменко, І. І. Ганусевич [та ін.] // *Доповіді НАН України.* – 2012. – № 1. – С. 182–188.
8. Стальная И. Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных жирных кислот / И. Д. Стальная ; под ред. В. Н. Ореховича // *Современные методы в биохимии.* – М. : Медицина, 1977. – С. 63–64.
9. Стальная И. Д. Метод определения малнового диальдегида с помощью тиобарбитуровой

кислоты / И. Д. Стальная, Т. Г. Гаришвили ; под ред. В. Н. Ореховича // *Современные методы в биохимии.* – М. : Медицина, 1977. – С. 66–68.

10. Correlation between plasma malondialdehyde and ceruloplasmin activity in patients with malignant haematological diseases / V. Gadjeva, D. Kutchukova, E. Aladjov, R. Georgieva // *Trakia Journal of Sciences.* – 2005. – **3**, № 2. – P. 29 – 33.

11. De Clerk Y. A. Inhibition of invasion and metastasis in cells transfected with an inhibitor of metalloproteinases / Y. A. De Clerk, N. Perez, H. Shimada // *Cancer research.* – 1992. – **52**. – P. 701–708.

12. Effects of radical oxygen species and NO: formation of intracellular hypoxia and activation of matrix metalloproteinases in tumor tissues / A. Burlaka, I. Ganusevich, E. Sidorik, S. Osinsky // *Exp. Oncol.* – 2006. – **28**. – P. 49–53.

13. Identification of complexes formed by ceruloplasmin with matrix metalloproteinases 2 and 12 / A. V. Sokolov, M. O. Pulina, K. V. Ageeva [et al.] // *Biochemistry (Mosc).* – 2009. – **74**, № 12. – P. 1388–1392.

14. Is coenzyme Q a key factor in aging? / G. Lopez-Lluch, J. C. Rodriguez-Aguilera, C. Santos-Ocana, P. Navas // *Mechanisms of Ageing and Development.* – 2010. – **131**. – P. 225–235.

15. Kader M. Effect of Grape Seeds Extract in the Modulation of Matrix Metalloproteinase-9 Activity and Oxidative Stress Induced By Doxorubicin in Mice / Monira A. Abd El Kader, Nermin M. El-Sammad, Amal A. Fyad // *Life Science Journal* – 2011. – **8**, № 3. – P. 510.

16. Muhammed H. Influence of ubiquinone on the inhibitory effect of adriamycin on mitochondrial oxidative phosphorylation / H. Muhammed, C.K.R. Kupur // *Biochem. J.* – 1984. – **214**. – P. 493–498.

17. Paramagnetic species in plasma of dogs with lymphoma prior to and after treatment with doxorubicin. An ESR study / L. Gille, M. Kleiter, M. Willmann, H. Nohl // *Biochemical Pharmacology.* – 2002. – **64**. – P. 1737–1744.

18. The use of multiplexed MRM for the discovery of biomarkers to differentiate iron-deficiency anemia from anemia of inflammation / D. Domanski, G. V. Freue, L. Sojo [et al.] // J. Proteomics. – 2011. – **26**. – P. 212–215.

19. Quiles J. L. Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity / J. L. Quiles, J. R. Huertas, M. Battino // Toxicology. – 2002. – **180**, № 1. – P. 79–95.

**А. П. Бурлака¹, Е. Б. Кучменко², Д. Н. Петухов², И. И. Ганусевич¹, С. Н. Лукин¹,
Е. В. Лукьянчук¹, Е. П. Сидорик¹, Н. В. Делеменчук², Г. В. Донченко²**
ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИИ, ОНКОЛОГИИ И РАДИОБИОЛОГИИ
ИМЕНИ Р. Е. КАВЕЦКОГО НАН УКРАИНЫ¹, КИЕВ
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ ИМЕНИ А. В. ПАЛЛАДИНА НАН УКРАИНЫ², КИЕВ

ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСА ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ И МОДУЛЯТОРА БИОСИНТЕЗА УБИХИНОНА НА СИСТЕМУ ЦЕРУЛОПЛАЗМИН/ ТРАНСФЕРРИН, СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ И БЕЛКОВ И АКТИВНОСТЬ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ В КРОВИ ЖИВОТНЫХ ПРИ ВВЕДЕНИИ ДОКСОРУБИЦИНА

Резюме

Важной составляющей токсического эффекта доксорубина является активация свободнорадикальных процессов окисления липидов и белков и возрастание активности матриксных металлопротеиназ (ММП), что может обуславливать усиление деструкции межклеточного матрикса. При этом наблюдается снижение содержания церулоплазмينا (ЦП) и трансферрина (ТФ) в крови животных. Применение совместно с доксорубином комплекса предшественников и модулятора убихинона и препарата убихинона CoQ10, по сравнению с его самостоятельным использованием, приводит к снижению содержания продуктов перекисного окисления липидов, карбонильных продуктов окисления белков, активности ММП-2 и ММП-9, повышению уровня ЦП и соотношения ЦП/ТФ в крови, что свидетельствует о нормализации антиоксидантного статуса в крови животных и уменьшении токсического влияния доксорубина.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: убихинон, матриксные металлопротеиназы, церулоплазмин, трансферрин.

**A. P. Burlaka¹, O. B. Kuchmenko², D. M. Petukhov², I. I. Hanusevych¹, S. M. Lukin¹,
Ye. B. Lukyanchuk¹, Ye. P. Sydoryk², N. V. Delemenchuk², H. V. Donchenko²**
R. YE. KAVETSKYI INSTITUTE OF EXPERIMENTAL PATHOLOGY, ONCOLOGY AND RADIOBIOLOGY
OF NAS OF UKRAINE¹, KYIV
PALLADIN INSTITUTE OF BIOCHEMISTRY OF NAS OF UKRAINE², KYIV

THE EFFECT OF COMPLEX OF PRECURSORS AND MODULATORS OF UBIQUINONE BIOSYNTHESIS ON CERULOPLASMIN/TRANSFERRIN, FREE-RADICAL PROTEIN AND LIPID PEROXIDATION, AND MATRIX METALLOPROTEINASE ACTIVITY IN ANIMAL BLOOD UNDER DOXORUBICIN TREATMENT

Summary

The important part of doxorubicin toxicity is activation of free-radical lipid and protein peroxidation and increase in activity of matrix metalloproteinases (MMP), which may lead to aggravated destruction of intracellular matrix. Decreased blood content of ceruloplasmin and transferrin is observed in animals under such conditions. The treatment by complex of precursors of modulators of ubiquinone biosynthesis in parallel to doxorubicin leads to significant decrease in content of products of lipid peroxidation, carbonile products of protein peroxidation, MMP-2 and MMP-9 activity, and to increase in blood ceruloplasmin and ceruloplasmin/transferrin ratio in comparison to the effect caused by doxorubicin alone. These changes signify the normalization of animals' blood antioxidant status and alleviation of toxic effects of doxorubicin.

KEY WORDS: ubiquinone, matrix metalloproteinases, ceruloplasmin, transferrin.

Отримано 21.05.12

Адреса для листування: А. П. Бурлака, Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології імені Р. Є. Кавецького НАН України, вул. Васильківська, 45, Київ, 03022, Україна, e-mail: iepor@onconet.kiev.ua.

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ДИКЛОФЕНАКУ ТА АМІЗОНУ
НА TRPV1 ВОРІТНОЇ ВЕНИ

У досліджах *in vitro*, у модельному експерименті на ворітній вені, вивчено вплив амізону та диклофенаку на ванілоїдний рецептор TRPV1. У дозі 1 мкмоль/л на фоні капсаїцину та капсазепіну відзначено ефект диклофенаку, який полягав у зміні амплітуд, але не частот гармонік скорочень, що не виключає його впливу на TRPV1. Не виявлено змін, що свідчать про вплив амізону на TRPV1.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: амізон, диклофенак, TRPV1, капсаїцин, капсазепін.

ВСТУП. Проблема знеболювання є однією з актуальних у сучасній медицині. На жаль, на сьогодні немає анальгетика, який би оптимально відповідав вимогам клініки. Застосування наркотичних анальгетиків обмежене та регламентоване через їх здатність викликати фізичну та психічну залежність, наркоманію. Ненаркотичні анальгетики ефективні, як правило, при помірному болю, і їм також притаманний широкий спектр побічних ефектів (ульцерогенна дія, гепатотоксичність, нефротоксичність та ін.). Одним із шляхів вирішення даної проблеми є оптимізація застосування вже існуючих анальгетичних засобів з урахуванням особливостей їх фармакодинаміки та фармакокінетики. У цьому напрямку проводять активні дослідження. Так, наприклад, в останні роки встановлено, що диклофенак, крім головного ЦОГ-залежного механізму дії, властивий ряд неЦОГ-залежних механізмів – вплив на альтернативний (ліпооксигеназний) шлях метаболізму арахідонової кислоти, інгібіція фосфоліпази A2, блок кислотозалежних іонних каналів (ASICs) та ін. [5, 7]. Протягом останніх років було виявлено ряд специфічних рецепторів, що містяться на ноцицептивних нейронах та відіграють значну роль у проведенні та сприйнятті ноцицептивних стимулів, серед яких слід виділити ванілоїдний рецептор (TRPV1) [1, 11]. Відомо про наявність ванілоїдного компонента знеболювальної дії у деяких ненаркотичних анальгетиків (парацетамол) [11].

Метою даної роботи було вивчити у порівняльному аспекті вплив диклофенаку та від-

носно нового препарату зі знеболювальною активністю “Амізон” на TRPV1 ворітної вени щурів у досліджах *in vitro*.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження виконано на 48 щурах-самцях віком 16–18 тижнів і масою 180–200 г розведення віварію Інституту фармакології та токсикології НАМН України. Тварин утримували на стандартному харчовому раціоні віварію [2]. В експерименті використовували субстанції диклофенаку та амізону. Як аналізатори застосовували агоніст ванілоїдного рецептора капсаїцин (Sigma, США) та його антагоніст капсазепін (Sigma, США). Щурів піддавали мортificaції. В експерименті використовували препарати ворітної вени тварин довжиною від 4 до 6 мм та масою 2–3,5 мг. Препарати судин перфузували розчином Кребса такого складу (в ммоль/л): NaCl – 133; KCl – 4,7; NaHCO₃ – 16,3; NaHPO₄ – 1,38; CaCl₂ – 2,5; MgCl₂ – 1,2; глюкоза – 7,8; pH – 7,4; температура – 37 °C. Досліджувані препарати застосовували у дозі 1 мкмоль/л. Концентрацію для капсаїцину та капсазепіну, що впливає на TRPV1, визначали експериментально, і вона складала 0,1 і 0,5 мкмоль/л відповідно [10]. Реєстрацію ізометричної сили препаратів проводили за допомогою тензометричного датчика, приєднаного до попереднього підсилювача та фільтра/підсилювача сигналу. Аналоговий сигнал перетворювався у цифровий вигляд за допомогою пристрою LabTrax (WPI, Inc). Цифрові дані реєстрували та записували у програмі “DataTrax2” (WPI, Inc). На оригінальних кривих скорочень ворітної вени виділялись ділянки тривалістю від 5 до

10 хв до та після введення досліджуваного препарату. В програмі "AutoSignal" (Seasolve Inc.) ці ділянки оцінювали якісно та кількісно. Дані для кількісної обробки вибирали за 5–10 с до початку введення препарату, дію якого досліджували, та в кінці виділених ділянок, що відповідало 5–10 с до відміни перфузії розчином з препаратом досліду. Отримані дані виражали у величині амплітуди скорочень (фактична потужність основної гармоніки скорочення), dB, та частоті скорочень (Герц, Hz). Дані наводили у відсотках до нормальних (у розчині Кребса).

Статистичну обробку результатів проводили методом вейвлет-аналізу [3].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Отримані дані наведено у таблицях 1–4. Показано, що агоніст ванілоїдних рецепторів (TRPV1) капсаїцин чинить вплив на скорочення ворітної вени, який є дозозалежним, що відображається як на амплітудах, так і на частотах основних гармонік. У використаних концентраціях капсаїцин зменшував частоту скорочень та збільшував

їх амплітуду (табл. 1). Ефекти капсаїцину на ворітну вену нівелювались та попереджувались антагоністом TRPV1 капсазепіном. Диклофенак чинив помітний дозозалежний вплив на скоротливу активність ворітної вени у вигляді пригнічення амплітуд основних гармонік скорочення та незначного збільшення частот (табл. 2). На відміну від диклофенаку, амізон фактично не змінював як амплітуди, так і частоти основних гармонік скорочень ворітної вени (табл. 2). При сумісному застосуванні диклофенаку та капсаїцину вплив диклофенаку на ворітну вену значно нівелювався за амплітудою скорочень, тоді як частоти основних гармонік залишалися рівними таким, що відслідковувались при дії капсаїцину. Базальна дія капсаїцину не змінювала впливу диклофенаку натрію за амплітудою та частотами скорочень (табл. 3, 4).

Ряд авторів в останні десятиріччя продемонстрував можливість змін спонтанних скорочень ворітної вени щурів речовинами, що пов'язані з ізоферментами циклооксигенази. Серед інших, наприклад, потенціювання

Таблиця 1 – Вплив диклофенаку натрію та амізону на спонтанну активність ворітної вени

Показник	Диклофенак (n=6)	Амізон (n=6)
Амплітуда, %	-27,3±5	+7,1±3,2
Частота	–	–
1-ша гармоніка, %	+7,1±3,3	-8,6±3,1
2-га гармоніка, %	+4,3±1,3	-9,3±4
3-тя гармоніка, %	+6,4±1,1	+7,2±2,7

Примітка. Для всіх досліджень вірогідність 95 %.

Таблиця 2 – Вплив агоністів та антагоністів TRPV1 на спонтанну активність ворітної вени

Показник	Капсаїцин (n=16)	Капсазепін (n=8)
Амплітуда, %	+30,3±5,3	-3,2±2,7
Частота	–	–
1-ша гармоніка, %	-13,2±3,7	+4,2±4,1
2-га гармоніка, %	-11,1±4,4	+5,7±4,3
3-тя гармоніка, %	-11,4±6	+2±3,4

Таблиця 3 – Дія диклофенаку натрію та амізону на фоні аплікації агоніста TRPV1

Показник	Диклофенак (n=6)	Амізон (n=8)
Амплітуда, %	+3,4±2	+20,1±1,3
Частота	–	–
1-ша гармоніка, %	-2,4±3,2	-7,4±2,6
2-га гармоніка, %	-3,3±4,4	-8,5±1,4
3-тя гармоніка, %	-3,3±2	-7,8±1,7

Таблиця 4 – Зміна амплітуди та частоти скорочень ворітної вени під впливом диклофенаку натрію та амізону на фоні дії антагоніста TRPV1 капсазепіну

Показник	Диклофенак (n=6)	Амізон (n=8)
Амплітуда, %	-25,3±2,2	-3±1,4
Частота	–	–
1-ша гармоніка, %	+3,1±1,3	+5±3,3
2-га гармоніка, %	+5,4±2,1	+2,3±1,2
3-тя гармоніка, %	+6,3±4,2	+3,2±2,3

простагландином E2, арахідоною кислотою та інгібування блокаторами ЦОГ [6, 8, 9]. Вплив на циклооксигеназний ланцюжок може суттєво позначитись на автоматичній та скоротливій активності ворітної вени. Інгібування ізоферментів ЦОГ перш за все відбивається на амплітуді скорочень (зменшення), тоді як інгібітори TRPV1 зменшують частоти основних скорочень. Логічно припустити, що при поєднанні препаратів цих різних груп вони могли б потенціювати дію один одного. Але ми отримали абсолютно протилежний результат, що може свідчити про існування різних шляхів впливу як ЦОГ, так і TRPV1 на спонтанну активність ворітної вени. Так, наприклад, вторинні месенджери агентів можуть відрізнятися у нормальних умовах та не

пересікатися, але значно взаємовпливати при патологічних порушеннях.

Щодо амізону, то у наших дослідах підтвердились перш за все його центральна дія та дія на рівні тканини. Ті мембранні механізми, з якими пов'язаний амізон, не проявили свого впливу на авторитмічну та спонтанну активність ворітної вени.

ВИСНОВКИ. 1. У вивчених концентраціях, у модельному експерименті на ворітній вені, на фоні агоніста й антагоніста TRPV1 виявлено ефект диклофенаку, що не виключає його впливу на TRPV1.

2. У вивчених концентраціях на фоні агоніста й антагоніста TRPV1 не виявлено ефекту амізону, який можна трактувати як вплив на ванілоїдний рецептор.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Миронов Н. Ю. Ванилоидные рецепторы: структура, участие в регулировании функций организма, терапевтический потенциал / Н. Ю. Миронов, В. В. Чурюканов // Экспер. и клин. фармакол. – 2006. – **69**, № 5. – С. 55–69.
2. Стефанов А. В. Доклинические исследования лекарственных средств : методические рекомендации / А. В. Стефанов. – К. : Авицена, 2002. – 568 с.
3. Теория и практика вейвлет-преобразования, ЗАО АВТЭКС Санкт-Петербург [Электронный ресурс]. – доступ к файлу – www.autex.spb.ru/wavelet
4. Annual (12) symposium in the cannabinoids asilomor conference center pacific grove C.A. USA 10.07.2002 – 14.07/ 2002. [Электронный ресурс]. – доступ к файлу – <http://cannabinoidsociety.org/HTML/ICRS.2002.symposium.pdf>
5. DrugBank database, DrugBank Version: 3.0- [Электронный ресурс]. – доступ к файлу – <http://www.drugbank.ca/>
6. Enero M. A. Effect of drugs on the force of spontaneous mechanical activity in rat portal vein / M. A. Enero // Acta Physiol. Latinoam. – 1979. – **29**. – P. 101–106.

7. Masubuchi Y. Diclofenac-induced inactivation of CYP3A4 and its stimulation by quinidine/ Y. Masubuchi, A. Ose, T. Horie // Drug metab. And Disp. – 2002. – **30**, № 10 – P. 1143–1187.

8. Messenger molecules of the phospholipase signaling system have dual effects on vascular smooth muscle contraction / C. Vidulescu, J. Mironneau, C. Mironneau, L. M. Popescu // J. Cell Mol. Med. – 2000. – **4**. – P. 196–206.

9. Miwa T. Prostaglandin E 1 potentiation of the spontaneous phasic contraction of rat isolated portal vein by a cyclopiazonic acid-sensitive mechanism / T. Miwa, M. Endou, F. Okumura // Br. J. Pharmacol. – 1997. – **120**. – P. 1419–1426.

10. Pegram B. L. The portal vein is a model for resistance vessels/ B. L. Pegram // Vascular neuroeffector mechanisms. – New-York : Raven Press, 1980. – **81**. – P. 42–44.

11. TRPV1 receptors in the CNS play a key role in broad-spectrum analgesia of TRPV1 antagonists / M. Cui, P. Honore, C. Zhong [et al.] // J. Neurosci. – 2006. – **26**, № 37. – P. 9385–9393.

И. Л. Мончак, О. Е. Ядловский, Т. А. Бухтиарова
ИНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГИИ И ТОКСИКОЛОГИИ НАМН УКРАИНЫ, КИЕВ

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ДИКЛОФЕНАКА И АМИЗОНА НА TRPV1 ВОРОТНОЙ ВЕНЫ

Резюме

В исследованиях *in vitro*, в модельном эксперименте на воротной вене, изучено влияние амизона и диклофенака на ванилоидный рецептор TRPV1. В дозе 1 мкмоль/л на фоне капсаицина и капсазепина

отмечен эффект диклофенака, который проявлялся в изменении амплитуд, но не частот гармоник сокращений, что не исключает его влияния на TRPV1. Не выявлены изменения, что свидетельствуют о влиянии амизона на TRPV1.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **амизон, диклофенак, TRPV1, капсаицин, капсазепин.**

I. L. Monchak, O. Ye. Yadlovskiy, T. A. Buhtiarova
INSTITUTE OF PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY OF NAMS OF UKRAINE, KYIV

THE EFFECT OF AMIZON AND DICLOFENAC ON TRPV1 OF PORTAL VEIN

Summary

In the experiments in vitro, in a model experiment on the portal vein, there was studied the effect of amizone and diclofenac on vailoid receptor TRPV 1. In the doses of 1 mmol/L on the background of capsazepin and capsaicin there was revealed the effect of diclofenac that expressed in the change of amplitudes but not the frequency of garmonic reductions that does not include its influence on TRPV 1. There were not revealed the changes, that indicate on the influence on TRPV1.

KEY WORDS: **amizon, diclofenac, TRPV1, capsaicin, capsazepin.**

Отримано 02.07.12

Адреса для листування: О. Є. Ядловський, Інститут фармакології та токсикології НАМН України, вул. Ежена Потье, 14, Київ, 03680, Україна.

Ю. В. Пивоваренко¹, О. В. Шабликін², О. М. Васильєв¹
 ННЦ "ФІЗИКО-ХІМІЧНЕ МАТЕРІАЛОЗНАВСТВО" КИЇВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ
 ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА ТА НАН УКРАЇНИ¹
 ІНСТИТУТ БІООРГАНІЧНОЇ ХІМІЇ ТА НАФТОХІМІЇ НАН УКРАЇНИ², КИЇВ

ПРИРОДА ВЗАЄМОДІЇ МІЖ КАТІОННИМИ N-ОКСИДФЕНАЗИНАМИ ТА ДНК

Досліджено взаємодії між катіоногенними N-оксидфеназинами та ДНК у водних розчинах різного складу, а також у розчинах, приготованих на воді з різним електричним потенціалом. На підставі аналізу умов, за яких відбуваються досліджувані взаємодії, зроблено висновок, що такі взаємодії є хімічними реакціями між ДНК та ОН-радикалами, які генеруються N-оксидфеназинами.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: феназини, N-оксидфеназини, АФК, ОН-радикали, ДНК.

ВСТУП. Для пояснення механізму взаємодії між катіоногенними N-оксидфеназинами та ДНК застосовують два незалежних підходи. Перший базується на моделі інтеркаляції [6, 9, 11, 16, 23, 24] та враховує здатність катіонних феназинів утворювати комплекси з речовинами біологічного походження [28], другий базується на хімічних властивостях феназинів [17–19, 22, 26, 27] та враховує здатність N-оксидфеназинів генерувати активні форми кисню (АФК) у біологічних системах (рис. 1) [17, 26].

Оскільки знання природи взаємодій між ДНК та катіоногенними N-оксидфеназинами необхідне для розуміння механізмів дії фена-

зинових антибіотиків та виникнення феназинових інтоксикацій [1, 18, 19, 21, 22, 26], ми провели дослідження, що мали на меті визначити, яким теоретичним уявленням краще відповідають умови таких взаємодій.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Синтез та очищення досліджуваних N-оксидфеназинів (рис. 2) здійснили відповідно до опублікованих методик [2, 5, 14, 15, 25].

Висновки про взаємодії між досліджуваними N-оксидфеназинами та ДНК робили на підставі бато- й (або) гіпохромних зсувів видимих ділянок спектрів поглинання N-оксидфеназинів, що реєструвалися після внесення до їх водних розчинів ДНК [20, 24]. Щоб уникнути похибок при реєстрації бато- та гіпохромних зсувів, які можуть становити 1–2 % [20], пов'язаних зі зміною концентрації розчинів N-оксидфеназинів, ~2 мг ДНК у сухому вигляді вносили безпосередньо у фотометричну кювету, що містила розчин досліджуваного N-оксидфеназину, і там розчиняли.

Воду з позитивним електричним потенціалом отримували за умов фільтрування дистильованої води через шар силікагелю, що є сорбентом іонів гідроксилу [4, 10, 12], або барботування дистильованої води киснем [10, 12] з її наступною дегазацією.

Воду з негативним електричним потенціалом отримували за умов фільтрування дистильованої води через шар активованого вугілля, що є сорбентом іонів водню [4, 10, 12], або барботування дистильованої води воднем [10, 12] з її наступною дегазацією.

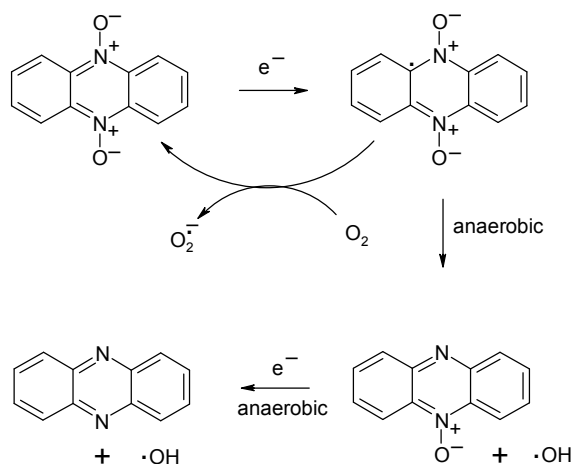


Рис. 1. Гіпотетичний механізм утворення N-оксидфеназинами ОН-радикалів. Вважають, що ОН-радикали, які за анаеробних умов та за присутності відновників генерують N-оксидфеназини, спроможні викликати пошкодження ДНК клітин пухлин [19, 22].

© Ю. В. Пивоваренко, О. В. Шабликін, О. М. Васильєв, 2012.

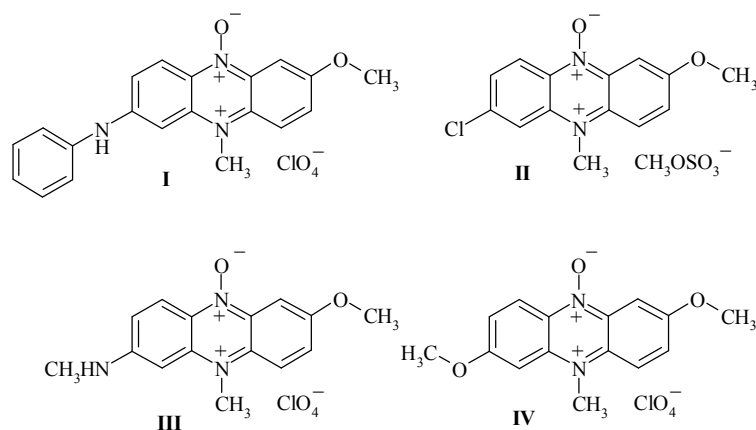


Рис. 2. Структурні формули досліджуваних N-оксидфеназінів:

- I – перхлорат 10-N-оксид-2-метокси-7-феніламін-5-метилфеназینیю,
 II – метилсульфат 10-N-оксид-2-метокси-7-хлорид-5-метилфеназینیю,
 III – перхлорат 10-N-оксид-2-метокси-7-метиламін-5-метилфеназینیю,
 IV – перхлорат 10-N-оксид-2,7-диметокси-5-метилфеназینیю.

Для дегазації воду протягом 10 хв витримували у вакуумному ексікаторі під тиском ~ 13 мм рт. ст.

Електричний (електродний) потенціал води визначали методом, який використовують для визначення потенціалу течії [4].

Насичення води воднем, киснем або повітрям здійснювали шляхом її барботування під тиском 1,01 атм. протягом 1 год.

Для реєстрації спектрів поглинання використовували спектрофотометр “Specord UV VIS” (Німеччина).

У роботі застосовували ДНК із тимуса теляти виробництва “Fluka” (Швейцарія) та інші реактиви виробництва “Укрреакхім” (Україна).

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Під час проведення спектральних досліджень було з’ясовано, що після внесення ДНК до водних розчинів досліджуваних N-оксидфеназінів видимі ділянки спектрів поглинання таких розчинів зазнавали бато- та (або) гіпохромних зсувів (рис. 3).

Літературні джерела надають декілька пояснень таким спектральним ефектам. Так, відповідно до 1–3 положень теорії кольорості [3, 13], такі спектральні зміни вказують на те, що за присутності ДНК відбувається хімічна модифікація досліджуваних N-оксидфеназінів. Згідно ж з уявленнями авторів, які розглядали взаємодії катіоногенних феназінів та ДНК в аспекті комплексоутворення [11, 20], такі зміни спектрів свідчать про утворення комплексів між досліджуваними N-оксидфеназинами та ДНК, а згідно з уявленнями прибічників моделі інтеркаляції – про утворення інтеркаляційних комплексів [24]. Щоб визначитись, яким теоретичним уявленням заре-

естровані спектральні зміни (рис. 3) відповідають краще, ми варіювали умови дослідів, які проводили.

Взаємодії досліджуваних N-оксидфеназінів з ДНК у водних розчинах з різною концентрацією NaCl та різними значеннями pH. Виявлено, що досліджувані N-оксидфеназини взаємодіють з ДНК у нейтральних водних розчинах із $[\text{NaCl}] < 0,2$ М, проте не взаємодіють з ДНК у нейтральних водних розчинах із $[\text{NaCl}] \geq 0,2$ М, тобто за умов, які сприяють стабілізації дволанцюгової структури молекул ДНК [16].

Встановлено, що досліджувані N-оксидфеназини взаємодіють з ДНК у водних розчинах із $\text{pH} \geq 6$, зокрема у розчинах з $\text{pH} 12,5$, тобто за умов лужного плавлення ДНК, коли молекули ДНК мають виключно одноланцюгову структуру [16].

Отримані результати довели, що досліджувані N-оксидфеназини не взаємодіють з дволанцюговими ДНК, проте взаємодіють з одноланцюговими. Оскільки ароматичні барвники можуть утворювати інтеркаляційні комплекси виключно з дволанцюговими В-ДНК [7, 16, 23], одержані результати засвідчили, що утворення інтеркаляційних комплексів не є причиною бато- та гіпохромних зсувів видимих ділянок спектрів поглинання досліджуваних N-оксидфеназінів (рис. 3).

Взаємодії досліджуваних N-оксидфеназінів з ДНК у розчинах, приготованих на воді з різним електричним потенціалом. Виявлено, що взаємодії досліджуваних N-оксидфеназінів з ДНК відбуваються у розчинах, приготованих на воді з потенціалом ≤ 0 мВ, та не відбуваються у розчинах, приготованих на воді з потенціалом $\geq +150$ мВ, тобто

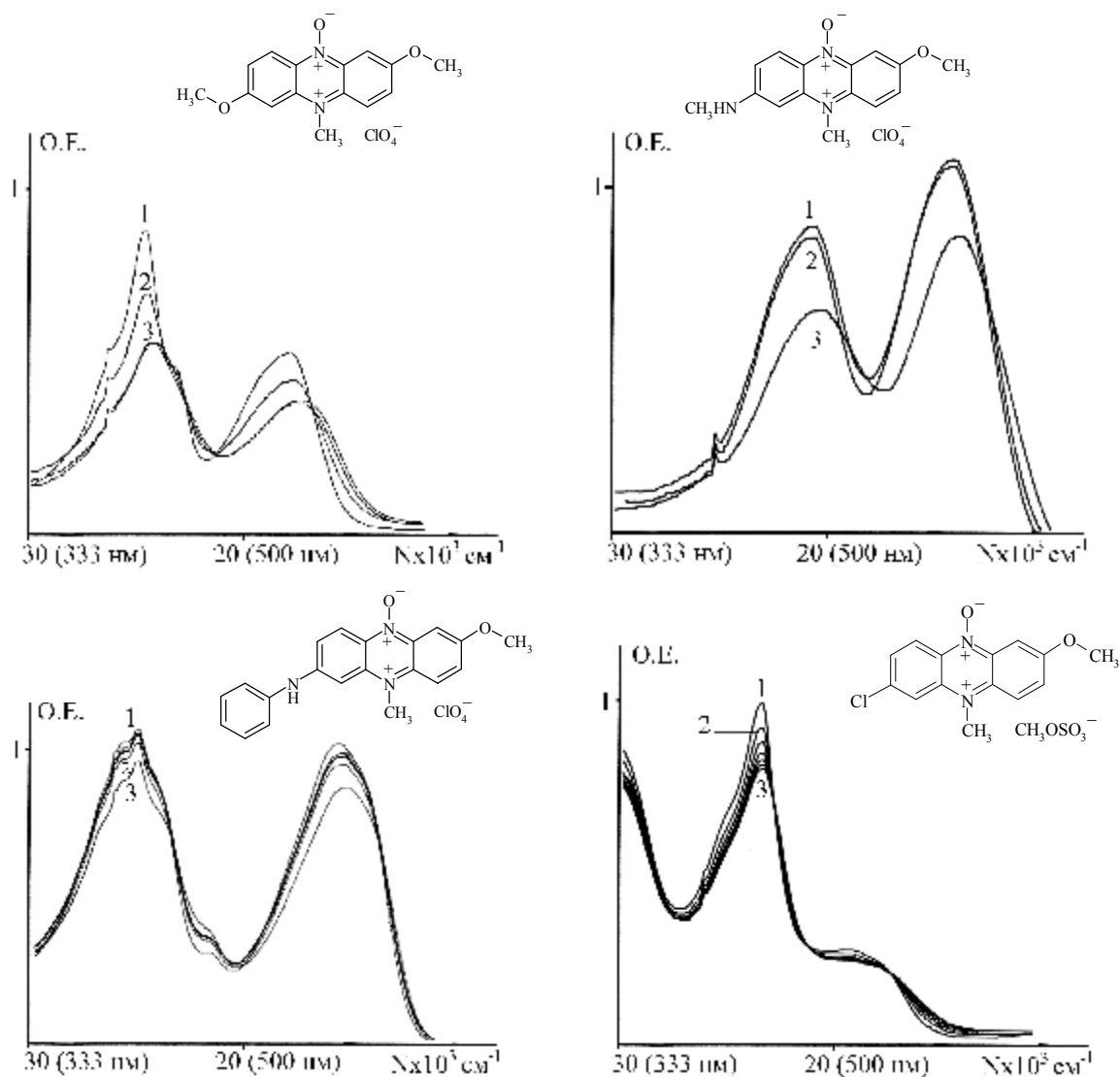


Рис. 3. Видимі ділянки спектрів поглинання: 1 – водні розчини N-оксидфеназінів; 2, 3 – водні розчини N-оксидфеназінів за зростаючих концентрацій ДНК та РНК. $N \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$ – хвильове число.

досліджувані взаємодії є потенціалозалежними. Потенціалозалежний характер взаємодій, що відбуваються з участю феназінів, свідчить про те, що за таких взаємодій феназини зазнають окиснювально-відновлювальних перетворень [17, 26, 27], а той факт, що взаємодії досліджуваних N-оксидфеназінів з ДНК відбуваються у розчинах, приготованих на воді з потенціалом $\leq 0 \text{ мВ}$, означає, що за таких взаємодій відновлюються N-оксидфеназини [17].

Застосувавши для пояснень потенціалозалежного характеру досліджуваних взаємодій механізми реакцій, наведені на рисунку 1, можна дійти висновку, що відновлення досліджуваних N-оксидфеназінів є наслідком генерації ними ОН-радикалів, яка відбувається у середовищі, збагаченому електронами.

Взаємодії досліджуваних N-оксидфеназінів з ДНК у розчинах, приготованих

на дегазованій воді, а також на воді, що насичена воднем, киснем або повітрям. Виявлено, що взаємодії досліджуваних N-оксидфеназінів з ДНК відбуваються у розчинах, приготованих на дегазованій воді та на воді, яка насичена воднем, і не відбуваються у розчинах, приготованих на воді, що насичена киснем або повітрям (табл.).

Застосування механізмів реакцій, наведених на рисунку 1, дозволяє пояснити наведену залежність так: генерація ОН-радикалів досліджуваними N-оксидфеназинами відбувається у дегазованих розчинах (тобто за анаеробних умов) та у розчинах, збагачених воднем (донором електронів), але не відбувається у розчинах, збагачених киснем.

Таким чином, ми переконались, що для пояснення природи взаємодій між досліджуваними N-оксидфеназинами та ДНК більш

Таблиця – Взаємодії досліджуваних N-оксидфеназинів з ДНК у розчинах, приготованих на дегазованій воді, а також на воді, що насичена воднем, киснем або повітрям

ДНК та гази, які містяться у розчинах N-оксидфеназинів	Взаємодії між ДНК та N-оксидфеназинами	Час взаємодії між ДНК та N-оксидфеназинами
ДНК+вакуум	+	під час розчинення
ДНК+H ₂	+	під час розчинення
ДНК+O ₂	–	∞
ДНК+повітря	–	∞

продуктивним є застосування механізмів реакцій, наведених на рисунку 1, а не моделі інтеркаляції. До того ж, на відміну від моделі інтеркаляції, використання наведених механізмів реакцій (рис. 1) дозволяє свідомо пропонувати способи підвищення ефективності катіоногенних N-оксидфеназинів у протипухлинній хіміотерапії, наприклад запропонувати сумісне застосування катіоногенних N-оксидфеназинів зі сполуками, що є донорами вод-

ню, зокрема з такими вітамінами, як аскорбінова чи тетрагідрофолієва кислота, або підвищують його вміст у кишечнику [8].

ВИСНОВКИ. За взаємодії з ДНК катіоногенні N-оксидфеназини зазнають хімічних перетворень. Внаслідок хімічних реакцій, що відбуваються між ДНК та катіоногенними N-оксидфеназинами, N-оксидфеназини, ймовірно, генерують ОН-радикали, які окиснюють ДНК.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Андреев С. Н. Бактериальная инфекция у больных ХОБЛ с острой дыхательной недостаточностью / С. Н. Андреев, А. Г. Шанина, А. Г. Чучалин // Клиника микробиологической антимикробной химиотерапии. – 2005. – **7**, № 3. – С. 245–254.
2. Барашенков Г. Г. Окислення четвертинних солей N-оксидів феназинів / Г. Г. Барашенков, С. Б. Серебряный, Д. М. Федоряк // Укр. хім. журн. – 1963. – **19**, № 3. – С. 322–324.
3. Винюкова Г. Н. Химия красителей / Г. Н. Винюкова. – М.: Химия, 1979. – 296 с.
4. Воюцкий С. С. Курс коллоидной химии / С. С. Воюцкий. – М.: Химия, 1976. – 512 с.
5. Грабенко А. Д. Электрофильные реакции замещения в ряду феназина. I. Нитрование N-окиси феназина / А. Д. Грабенко, С. Б. Серебряный // Укр. хім. журн. – 1955. – **21**, № 2. – С. 249–252.
6. Дубей І. Я. Кон'югати олігонуклеотидів з інтеркаляторами: синтез та біологічна активність / І. Я. Дубей // Ukrainian Bioorganica Acta. – 2006. – № 1. – С. 42–59.
7. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот / В. Зенгер. – М.: Мир, 1987. – 584 с.
8. Использование препарата Эспумизан в практике гастроэнтеролога / Н. В. Харченко, В. В. Черненко, И. Н. Червак [и др.] // Здоров'я України. – 2008. – № 6, вып. 1. – С. 52–53.
9. Исследование взаимодействия производных феназина с ДНК методом поляризованной флуоресценции / Ю. П. Благой, В. Н. Зозуля, И. М. Волошин [и др.] // Биополимеры и клетка. – 1997. – **13**, № 1. – С. 22–29.
10. Ляхов А. М. Потенциалзависимые свойства воды и водных растворов / А. М. Ляхов, Ю. В. Пивоваренко // Спортивная медицина. – 2006. – № 1. – С. 149–152.
11. Морощкина Е. Б. Взаимодействие ДНК с производными феназинов / Е. Б. Морощкина, М. Г. Сафьянникова // Биофизика. – 1999. – **44**, № 3. – С. 425–429.
12. Некрасов Б. В. Основы общей химии / Б. В. Некрасов. – М.: Химия, 1974. – Т. 1. – 656 с.
13. Пацак Й. Органическая химия / Й. Пацак. – М.: Мир, 1986. – 366 с.
14. Серебряный С. Б. Аминирование алкилфеназиновых солей / С. Б. Серебряный, П. А. Юфа // Укр. хім. журн. – 1963. – **19**, № 3. – С. 322–324.
15. Серебряный С. Б. Электрофильные реакции замещения в ряду феназина / С. Б. Серебряный // Укр. хім. журн. – 1956. – **22**, № 4. – С. 507.
16. Шабарова З. А. Химия нуклеиновых кислот и их компонентов / З. А. Шабарова, А. А. Богданов. – М.: Химия, 1978. – 584 с.
17. Эльдерфилд Р. К. Гетероциклические соединения / Р. К. Эльдерфилд. – М.: Издательство иностранной литературы, 1960. – Т. 6. – 612 с.
18. Bioactive Heterocycles V: No. 5 (Topics in Heterocyclic Chemistry) [Series editor R. R. Gupta, Volume editor Khan M. T. H.]. – Springer. – 2007. – 342 p.
19. DNA Cleavage by Oxygen Radicals Produced in the Absence of Metal Ions or Light / Katsuyuki Nagai, J. Barbara Carter, Jinwen Xu, M. Sidney Hecht. // J. Am. Chem. Soc. – 1991. – **113**. – P. 5099 – 5100.
20. Hollstein U. Interaction of Phenazines with

Polydeoxyribonucleotides / U. Hollstein, R. Y. Van Gemert. // Biochemistry. – 1971. – **10**, № 3. – P. 497–504.

21. In vitro inhibition of lymphocyte proliferation by *Pseudomonas aeruginosa* phenazine pigments / R. U. Sorensen, J. D. Klinger, H. A. Cach [et al.] // Infectious Immunology. – 1983. – **41**, № 1. – P. 321 – 330.

22. Katsuyuki Nagai Hecht. Site-specific Cleavage by Antisense Oligonucleotides Covalently Linked to Phenazine Di-N-oxide / Katsuyuki Nagai, M. Sidney // J.B.C. – 1991. – **266**, № 35. – P. 23994 – 24002.

23. Lerman L. S. Structural considerations in the interaction of DNA and acridines / L. S. Lerman // Journal Molecular Biology. – 1961. – **3**. – P. 18–30.

24. Long E. C. On Demonstrating DNA Interaction /

E. C. Long, J. K. Barton // Acc. Chem. Res. – 1990. – **23**, № 9. – P. 273–279.

25. McIlwain H. J. The Phenazine Series. Part IV. Reactions of Alkyl Phenazinium Salts / H. J. McIlwain // Journal Chemical Society. – 1937. – P. 1704–1711.

26. Michaelis L. Potentiometric Studies on Semi-quinones / L. Michaelis, E. S. Hill // J. Amer. Chem. Soc. – 1933. – **55**, № 4. – P. 1481 – 1494.

27. Michaelis L. The Viologen Indicators / L. Michaelis, E. S. Hill // The Rockefeller University Press – 1933. – **16**. – P. 6859 – 6873.

28. Swan G. A. The Chemistry of Heterocyclic Compounds / G. A. Swan. – New York: Interscience Publishers, 1957. – 643 p.

Ю. В. Пивоваренко¹, О. В. Шаблыкин², А. Н. Васильев¹

УНЦ “ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЕ МАТЕРИАЛОВЕДЕНИЕ” КИЕВСКОГО НАЦИОНАЛЬНОГО УНИВЕРСИТЕТА
ИМЕНИ ТАРАСА ШЕВЧЕНКО И НАН УКРАИНЫ¹

ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ И НЕФТЕХИМИИ НАН УКРАИНЫ², КИЕВ

ПРИРОДА ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ МЕЖДУ КАТИОННЫМИ N-ОКСИДФЕНАЗИНАМИ И НУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ

Резюме

Исследованы взаимодействия между катионными N-оксидфеназинами и ДНК в водных растворах различного состава, а также в растворах, приготовленных на воде с разным электрическим потенциалом. Из анализа условий, при которых происходят исследуемые взаимодействия, сделан вывод о том, что такие взаимодействия являются химическими реакциями между ДНК и ОН-радикалами, генерируемыми N-оксидфеназинами.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: феназины, N-оксидфеназины, АФК, ОН-радикалы, ДНК.

Yu. V. Pyvovarenko¹, O. V. Shablykin², O. M. Vasylyev¹

RESEARCH AND TRAINING CENTER PHYSICAL AND CHEMICAL MATERIALS SCIENCE
OF TARAS SHEVCHENKO KYIV UNIVERSITY AND NAS OF UKRAINE¹
INSTITUTE OF BIOORGANIC CHEMISTRY AND PETROCHEMISTRY OF NAS OF UKRAINE², KYIV

NATURE OF INTERACTION BETWEEN THE CATION N-OXIDPHENAZINES AND NUCLEIC ACIDS

Summary

The interaction between the cationic N-oxidephenazines and DNA in aqueous solutions was studied. These results correlate well with the hypothesis that such interactions are chemical reactions between DNA and OH-radicals generated by N-oxidephenazines.

KEY WORDS: phenazine, N-oxidphenazines, ROS, OH-radicals, DNA.

Отримано 21.05.12

Адреса для листування: Ю. В. Пивоваренко, вул. Клименка, 8, кв. 39, Київ-37, 03037, Україна, e-mail: y.pivovarenko@gmail.com.

**МЕТАБОЛІЗМ АЦЕТИЛХОЛІНУ В ПОШКОДЖЕНОМУ АДРЕНАЛІНОМ
МІОКАРДІ САМЦІВ І САМОК ЩУРІВ ЗА ЗАСТОСУВАННЯ БЛОКАТОРА
АТФ-ЧУТЛИВИХ КАЛІЄВИХ КАНАЛІВ ГЛІБЕНКЛАМІДУ ТА БЛОКАТОРА
КАЛЬЦІЄВИХ КАНАЛІВ ВЕРАПАМІЛУ**

У досліджах на статевозрілих самцях і самках щурів вивчено вплив блокатора АТФ-чутливих калієвих каналів глібенкламід і блокатора кальцієвих каналів верапаміл на вміст та інтенсивність ферментативного гідролізу ацетилхоліну в міокарді передсердь і шлуночків при розвитку некротичного процесу в серці. Встановлено, що глібенкламід не змінює характеру динаміки вмісту ацетилхоліну в міокарді самців при пошкодженні серця адреналіном, у серці самок спостерігаються накопичення ацетилхоліну в міокарді передсердь і зменшення в міокарді шлуночків. Активність ферментативного гідролізу ацетилхоліну за цих умов суттєво зростає, інтенсивнішими такі зміни є в самців. Розвиток некротичного процесу на тлі верапамілу супроводжується менш інтенсивним зниженням вмісту ацетилхоліну в серці самців, незважаючи на більшу активність його ферментативного гідролізу, а в самок вміст ацетилхоліну та активність його розщеплення в міокарді передсердь підтримуються на вихідному рівні, тоді як у шлуночках зменшуються дещо інтенсивніше на тлі зростання активності ферментативного розщеплення медіатора.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: некроз міокарда, стать, глібенкламід, верапаміл, метаболізм ацетилхоліну.

ВСТУП. У зростанні захворюваності на серцево-судинну патологію провідну роль відіграє сучасний ритм життя, який характеризується постійними стресовими ситуаціями. Гіперадреналемія, що при цьому розвивається, призводить до пошкодження міокарда за рахунок різних механізмів, урахування яких лежить в основі стратегії пошуку кардіопротекторів. Серед таких чільне місце займають модулятори активності іонних каналів. Доля міокарда за умов стресу суттєво залежить від участі холінергічних механізмів як стреслімітуючих, покликаних обмежувати ефекти пошкоджувальних чинників на серцевий м'яз [7]. Подібна роль притаманна естрогенам, що й визначає менший, порівняно з чоловіками аналогічного віку, відсоток жінок, які страждають від інфаркту міокарда. Проте в період менопаузи (природної чи хірургічної) така різниця нівелюється [8], що й визначає актуальність досліджень, які доводять суттєву роль статевих гормонів у патогенезі пошкодження міокарда. Оскільки реалізація патогенного впливу на серце стресорного гормону адреналіну та захисної дії ацетилхоліну здійснюється за рахунок іонних каналів, то для глибшого розуміння процесів, які відбуваються в

© М. Р. Хара, Р. С. Усинський, 2012.

серці за умов патології, особливий інтерес становлять дослідження ролі статевих гормонів у їх здатності сприяти пошкодженню міокарда чи його протекції з участю іонних каналів.

Метою дослідження було вивчити вплив модуляторів іонних каналів на метаболізм ацетилхоліну в пошкодженному адреналіном міокарді залежно від статі.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження було проведено на 108 білих нелінійних щурах обох статей (170–210 г). Тварин поділили на три групи: 1-ша – інтактні самці (♂) та самки (♀); 2-га – ♂ та ♀, яким вводили блокатор АТФ-чутливих калієвих каналів глібенкламід (ГЛ); 3-тя – ♂ та ♀, яким вводили блокатор кальцієвих каналів верапаміл (ВП). Глібенкламід (1 мг/кг, у черевну порожнину, одномоментно) вводили за 2 год [4], а верапаміл (5 мг/кг, внутрішньом'язово, одномоментно) – за 30 хв до ін'єкції кардіотоксичної дози адреналіну (1 мг/кг, внутрішньом'язово, одномоментно), відтворюючи при цьому адреналінове пошкодження міокарда (АПМ). Тварин досліджували через 1 та 24 год після ін'єкції катехоламіну [5, 6]. У міокарді передсердь (ПС) та шлуночків (ШЛ) визначали вміст ацетилхоліну (АХ) біологічним методом [1] та активність

ферментативного його гідролізу, який оцінювали за показником загальної холінестеразної активності (ЗХЕА) [2]. Усі експерименти на щурах проводили відповідно до Загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених на Першому національному конгресі з біоетики (Київ, 2001) та узгоджених з положеннями Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986) [3]. Отримані результати піддавали статистичній обробці для визначення середнього арифметичного (M), стандартної похибки середнього арифметичного (m), критерію Стюдента (t). Достовірною вважали відмінність при значенні $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. При аналізі отриманих даних було встановлено, що вміст АХ у ПС інтактних σ^7 був на 9 % меншим, ніж у ϕ (табл. 1). На 1 і 24 год розвитку АПМ даний показник знижувався, що у σ^7 склало, відповідно, 15,8 та 30,1 %, а в ϕ – 24,8 та 34,5 %. Різниці між статями ні на 1, ні на 24 год АПМ не було.

ЗХЕА міокарда ПС на 1 та 24 год експерименту зменшувалася (табл. 1). Так, у σ^7 це становило 42,9 % та 2,3 раза, а в ϕ – 9,9 і 14,9 %. Якщо значення даного показника інтактних ϕ було в 2,3 раза більшим від такого в σ^7 , то на 1 год розвитку АПМ перевага становила 1,5 раза, а на 24 год – лише 1,2 раза.

Уведення ГЛ сприяло тому, що вміст АХ у міокарді ПС контрольних σ^7 збільшився на 6,0 %, а в ПС ϕ – зменшився на 38,6 %, завдяки

чому даний показник σ^7 став на 56,9 % вищим, ніж в особин протилежної статі (табл. 1). Розвиток АПМ на такому тлі супроводжувався зниженням вмісту АХ у ПС σ^7 , що на 1 год спостереження склало 17 %, а на 24 год – 30,5 %. У ПС ϕ динаміка була хвилеподібною, зокрема на 1 год АПМ даний показник зріс на 13,5 %, а на 24 год почав зменшуватись, проте був на 10 % більшим за вихідне значення. Порівняння абсолютних значень σ^7 і ϕ показало, що на 1 год АПМ вміст АХ у ПС σ^7 був на 14,5 % вищим, ніж у ϕ , а на 24 год експерименту різниці за даним показником між тваринами різної статі не спостерігалось. Отримані результати свідчать про те, що застосування ГЛ суттєво зменшує вміст АХ у міокарді ПС самок, що сприяє нівелюванню встановленої між різностатевими особинами різниці за умов розвитку АПМ. Цікаво, що при використанні ГЛ у σ^7 на 1 год АПМ вміст АХ у міокарді ПС був на 4,5 % більшим, ніж у тварин без корекції, а на 24 год – на 5,4 %. У ϕ на 1 год експерименту вміст АСТ медіатора в ПС був меншим на 7,3 %, а на 24 год – на 8,9 % більшим.

Після введення ГЛ ЗХЕА міокарда ПС суттєво зменшувалась, що в σ^7 склало 5,1 раза, а в ϕ – 2,8 раза (табл. 2). Менш інтенсивна динаміка в ϕ , найімовірніше, була проявом адаптації пейсмейкерів синусового вузла до суттєвого зниження вмісту медіаторної фракції АХ. На 1 год розвитку АПМ на тлі ГЛ ЗХЕА ПС в σ^7 зросла в 2,9 раза, а на 24 год – у 4,3 раза порівняно з контролем, а в самок – у 2,3 і 2,7 раза відповідно. Варто зазначити, що при застосуванні ГЛ ЗХЕА в ПС σ^7 на 1 год

Таблиця 1 – Вміст ацетилхоліну в міокарді передсердь і шлуночків щурів у динаміці адреналінового пошкодження на тлі глібенкламіду та верапамілу (мкмоль/кг, $M \pm m$, $n=6$)

Група		Стать	Контроль		АПМ 1 год		АПМ 24 год	
Передсердя	Без корекції (1-ша група)	σ^7	13,3 $\pm$ 0,13	1	11,2 $\pm$ 0,21	2	9,3 $\pm$ 0,10	3
		ϕ	14,5 $\pm$ 0,06	4	10,9 $\pm$ 0,04	5	9,5 $\pm$ 0,07	6
	ГЛ (2-га група)	σ^7	14,1 $\pm$ 0,11	7	11,7 $\pm$ 0,06	8	9,8 $\pm$ 0,13	9
		ϕ	8,9 $\pm$ 0,1	10	10,1 $\pm$ 0,09	11	9,8 $\pm$ 0,11	12
	ВП (3-тя група)	σ^7	14,5 $\pm$ 0,06	13	11,9 $\pm$ 0,П	14	9,8 $\pm$ 0,08	15
		ϕ	10,5 $\pm$ 0,08	16	11,2 $\pm$ 0,15	17	10,5 $\pm$ 0,06	18
Шлуночки	Без корекції (1-ша група)	σ^7	5,3 $\pm$ 0,31	19	3,2 $\pm$ 0,16	20	2,1 $\pm$ 0,22	21
		ϕ	5,6 $\pm$ 0,15	22	2,2 $\pm$ 0,11	23	2,3 $\pm$ 0,16	24
	ГЛ (2-га група)	σ^7	4,2 $\pm$ 0,11	25	3,0 $\pm$ 0,08	26	2,3 $\pm$ 0,04	27
		ϕ	6,1 $\pm$ 0,05	28	2,3 $\pm$ 0,07	29	2,3 $\pm$ 0,07	30
	ВП (3-тя група)	σ^7	5,9 $\pm$ 0,18	31	3,0 $\pm$ 0,П	32	2,9 $\pm$ 0,13	33
		ϕ	6,9 $\pm$ 0,15	34	3,3 $\pm$ 0,15	35	2,9 $\pm$ 0,15	36

Примітка. $p_{1-2} < 0,001$, $p_{1-3} < 0,001$, $p_{1-4} < 0,001$, $p_{1-7} < 0,001$, $p_{1-13} < 0,001$, $p_{2-4} < 0,001$, $p_{2-14} < 0,02$, $p_{3-15} < 0,05$, $p_{4-10} < 0,001$, $p_{4-16} < 0,001$, $p_{6-18} < 0,001$, $p_{7-8} < 0,001$, $p_{7-10} < 0,001$, $p_{7-9} < 0,001$, $p_{8-11} < 0,001$, $p_{10-11} < 0,001$, $p_{10-12} < 0,001$, $p_{13-14} < 0,001$, $p_{13-15} < 0,001$, $p_{16-17} < 0,01$, $p_{19-20} < 0,001$, $p_{19-21} < 0,001$, $p_{19-25} < 0,001$, $p_{20-23} < 0,001$, $p_{21-33} < 0,02$, $p_{22-23} < 0,001$, $p_{22-24} < 0,001$, $p_{22-28} < 0,001$, $p_{22-34} < 0,001$, $p_{23-35} < 0,001$, $p_{24-36} < 0,05$, $p_{25-26} < 0,001$, $p_{25-27} < 0,001$, $p_{25-28} < 0,001$, $p_{26-29} < 0,001$, $p_{28-29} < 0,001$, $p_{28-30} < 0,001$, $p_{31-32} < 0,001$, $p_{31-33} < 0,001$, $p_{34-35} < 0,001$, $p_{34-36} < 0,001$.

Таблиця 2 – Загальна холінестеразна активність міокарда передсердь і шлуночків тварин при розвитку адреналінового пошкодження на тлі глібенкламід у та верапамілу (ммоль/(кг·год, $M \pm m$, $n=6$)

Група		Стать	Контроль	АПМ 1 год	АПМ 24 год
Передсердя	Без корекції (1-ша група)	♂	362,1±1,7 ₁	206,6±2 ₂	157,5±2,1 ₃
		♀	154,3±2,4 ₄	139,1±2,4 ₅	131,3±3 ₆
	ГЛ (2-га група)	♂	71,1±1,2 ₇	209,1±1,9 ₈	305,8±1,8 ₉
		♀	56,2±1,1 ₁₀	130,1±2,3 ₁₁	150,4±3,3 ₁₂
	ВП (3-тя група)	♂	202,6±2,4 ₁₃	201,8±2,3 ₁₄	250,3±1,6 ₁₅
		♀	158,8±2,5 ₁₆	150,2±1,9 ₁₇	158,6±2,1 ₁₈
Шлуночки	Без корекції (1-ша група)	♂	160,4±2,1 ₁₉	102,3±1,8 ₂₀	89,6±1 ₂₁
		♀	103,1±1,2 ₂₂	86,3±1,6 ₂₃	82,8±1,8 ₂₄
	ГЛ (2-га група)	♂	45,6±0,9 ₂₅	92,9±0,6 ₂₆	165,9±0,7 ₂₇
		♀	37,5±0,8 ₂₈	59,4±1,2 ₂₉	56±1,8 ₃₀
	ВП (3-тя група)	♂	32,5±0,9 ₃₁	72,4±1,5 ₃₂	133±1,1 ₃₃
		♀	24,7±1,8 ₃₄	54,2±1,2 ₃₅	73,4±1 ₃₆

Примітка. $p_{1-2}<0,001$, $p_{1-3}<0,001$, $p_{1-4}<0,001$, $p_{1-7}<0,001$, $p_{1-13}<0,001$, $p_{2-5}<0,001$, $p_{3-6}<0,001$, $p_{3-9}<0,001$, $p_{4-5}<0,002$, $p_{4-6}<0,001$, $p_{4-10}<0,001$, $p_{5-11}<0,05$, $p_{5-17}<0,05$, $p_{6-12}<0,002$, $p_{6-18}<0,001$, $p_{7-8}<0,001$, $p_{7-9}<0,001$, $p_{10-11}<0,001$, $p_{10-12}<0,001$, $p_{13-15}<0,001$, $p_{16-17}<0,05$, $p_{19-25}<0,001$, $p_{19-31}<0,001$, $p_{20-32}<0,001$, $p_{21-33}<0,001$, $p_{22-28}<0,001$, $p_{23-35}<0,001$, $p_{24-36}<0,002$, $p_{25-26}<0,001$, $p_{25-27}<0,001$, $p_{26-29}<0,001$, $p_{27-30}<0,001$, $p_{28-29}<0,001$, $p_{28-30}<0,001$, $p_{31-32}<0,001$, $p_{31-33}<0,001$, $p_{32-34}<0,001$, $p_{34-35}<0,001$, $p_{34-36}<0,001$.

розвитку АПМ достовірно не відрізнялась, а у ♀ була на 6,5 % меншою порівняно з 1-ю групою тварин, на 24 год експерименту вона переважала порівнювані значення, зокрема у ♂ – в 1,9 раза, а в самок – лише 14,5 %, що свідчило про різну роль естрогенів та андрогенів у здатності ГЛ забезпечувати притаманні йому функції.

У міокарді ШЛ контрольних ♂ та ♀ вміст АХ був практично однаковим (табл. 1). На 1 і 24 год розвитку АПМ цей показник зменшувався у тварин обох статей, зокрема у ♂ – в 1,7 та 2,5 раза, а в ♀ – у 2,5 та 2,4 раза відповідно. Слід зауважити, що на 1 год експерименту вміст АХ у міокарді ШЛ ♂ був в 1,5 раза більшим, ніж в ♀, при відсутності такої різниці на 24 год спостереження. Уведення ГЛ мало наслідком зменшення вмісту АХ у міокарді ШЛ ♂ на 20,8 %, а в ♀ – збільшення на 8,9 %, що демонструвало різний вплив блокатора АТФ-чутливих калієвих каналів у зазначеній дозі на вміст медіатора в міокарді даного відділу серця. Розвиток АПМ на тлі ГЛ також супроводжувався зниженням вмісту АХ. У ♂ це мало прогресуючий характер, про що свідчило зменшення показника на 28,6 % на 1 год спостереження та на 45,2 % – на 24 год порівняно з контролем даної групи. У ♀ суттєве, що становило 62,3 %, зниження абсолютного значення показника реєстрували на 1 год АПМ зі збереженням цієї різниці на 24 год спостереження. Варто зазначити, що вміст АХ на тлі ГЛ у міокарді ШЛ ♂ в контрольній групі був на 31,1 % меншим, на 1 год АПМ – на 23,3 %

більшим, ніж у ♀, за відсутності такої різниці на 24 год експерименту.

Після введення ГЛ ЗХЕА міокарда ШЛ зменшилась. Інтенсивнішими такі зміни були в ♂, зниження показника в яких становило 3,5 раза, тоді як у ♀ – 2,7 раза (табл. 2). Враховуючи те, що вміст АХ був більшим, а ЗХЕА меншою у самок, можна констатувати факт, що їх серце більш захищене за умов блокади АТФ-чутливих калієвих каналів. Розвиток АПМ на такому тлі характеризувався зростанням аналізованого показника у тварин обох статей. На 1 год експерименту величина динаміки склала 1,6 раза у ♀ і 2,0 рази у ♂, а на 24 год – 1,5 та 3,6 раза відповідно. Варто зазначити, що при застосуванні ГЛ ЗХЕА ШЛ ♂ на 1 год АПМ була в 1,5 раза, а на 24 год – в 3,0 рази більшою, ніж у ♀.

Уведення ВП викликало нагромадження АХ у міокарді ПС ♂, що склало 9,0 %, та його зменшення на 38,1 % в ♀, що було черговим підтвердженням суттєвішої чутливості організму самок до модулюючого впливу застосованих середників (табл. 1). Розвиток АПМ на цьому тлі характеризувався зниженням досліджуваного показника у ♂, що на 1 год експерименту склало 21,8 %, а на 24 год – 48,0 %. У ♀ динаміка була іншою: на 1 год АПМ вміст АХ у міокарді ПС підвищився на 6,7 %, а на 24 год знизився до вихідного рівня даної групи тварин. Попереднє введення ВП незначно вплинуло на вміст АХ у ПС тварин при розвитку АПМ. Так, у ♂ значення цього показника на 1 год АПМ було на 5,9 % більшим, ніж у тварин

без корекції, а у самок такої різниці не спостерігалось. На 24 год АПМ, яка розвивалася на тлі ВП, вміст АХ у ПС ♂ був на 3,2 %, а у самок на 10,5 % вищим, ніж у тварин без корекції.

Застосування ВП викликало зменшення ЗХЕА міокарда ПС ♂ на 44 % і не вплинуло на цей показник у ♀ (табл. 2). Розвиток АПМ на такому тлі супроводжувався різною динамікою даного показника у тварин різної статі. На 1 год експерименту в ♀ він зменшився лише на 5,7 %, а на 24 год повернувся до вихідного значення. В ♂ тільки на 24 год експерименту зріс на 23,5 %. Важливо зазначити, що ЗХЕА міокарда ПС ♀, у яких АПМ розвивалося на тлі ВП, була більшою, ніж без такого впливу, на 1 год на 8 %, а 24 год – на 20,8 %. У самців вона була вищою лише на 24 год – на 58,9 % внаслідок різноспрямованої динаміки у тварин різної статі.

Вміст АХ у міокарді ШЛ ♂ після введення ВП достовірно не змінився, а в ♀ зріс на 23,2 % (табл. 1). При розвитку АПМ на такому тлі у ♂ зменшення даного показника на 1 год експерименту склало 49,2 %, а на 24 год – 50,8 %, у ♀ – 52,2 і 58,0 % відповідно. Порівняння абсолютних значень у тварин різної статі показало, що і на 1, і на 24 год розвитку АПМ вміст АХ у міокарді ШЛ ♀ та ♂ достовірно не відрізнявся. При порівнянні тварин цієї ж групи з групою щурів без корекції встановлено, що на 1 год розвитку АПМ у ♂ різниці за даним показником не спостерігалось, а на 24 год він був на 38,1 % більшим при застосуванні ВП, у ♀ на 1 год АПМ переважав показник 1-ї групи тварин – на 50 %, а на 24 год – на 26,1 %.

Після введення ВП різко знизилась ЗХЕА міокарда ШЛ у тварин обох статей: у ♂ – в 4,9 раза, а в ♀ – в 4,2 раза (табл. 2). Розвиток

АПМ на цьому тлі характеризувався зростанням досліджуваного показника у ♂ і ♀ на 1 год у 2,2 раза в обох випадках, а на 24 год – в 4,1 та 3,0 рази відповідно. Порівняно з ♂ 1-ї групи на 1 год АПМ даний показник був меншим на 29,2 %, а в ♀ – на 37,2 %, на 24 год у ♂ переважав порівнюване значення на 48,4 %, а в ♀ був нижчим на 11,4 %.

ВИСНОВКИ. 1. Глібенкламід не має суттєвого впливу на характер динаміки вмісту ацетилхоліну в міокарді передсердь та шлуночків самців при пошкодженні серця адреналіном, ступінь таких змін є суттєвішим у міокарді шлуночків. Розвиток некротичного процесу в серці самок на тлі глібенкламідів відбувається на фоні накопичення ацетилхоліну в міокарді передсердь і більш суттєвого, ніж без такого впливу, зменшення в міокарді шлуночків. Активність ферментативного гідролізу ацетилхоліну за таких умов суттєво зростає, інтенсивнішими такі зміни є в самців.

2. Розвиток некротичного процесу на тлі верапамілу супроводжується менш інтенсивним, ніж без нього, зниженням вмісту ацетилхоліну в міокарді обох відділів серця самців, незважаючи на більшу активність його ферментативного гідролізу. В самок за таких умов вміст ацетилхоліну та активність його розщеплення в міокарді передсердь підтримуються на вихідному рівні, а в шлуночках зменшуються дещо інтенсивніше на тлі зростання активності ферментативного розщеплення медіатора.

Перспективи подальших досліджень полягають у дослідженні впливу модуляторів іонних каналів на ступінь структурного пошкодження в міокарді тварин різної статі.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Біологічний метод визначення вмісту ацетилхоліну в міокарді щурів / В. В. Файфура, Л. М. Сас, Н. Я. Потіха, С. В. Дзига // Мед. хімія. – 2004. – 6, № 4. – С. 118–121.
2. Визначення активності холінестерази в міокарді щурів / М. Р. Хара, Л. М. Сас, Н. Я. Потіха [та ін.] // Здобутки клін. та експер. мед. – 2006. – № 2. – С. 110–112.
3. Загальні етичні принципи експериментів на тваринах // Ендокринологія. – 2003. – 8, № 1. – С. 142–145.
4. Ткаченко Г. Роль трансаміназних реакцій у процесах енергозабезпечення печінки щурів за

введення модуляторів K^+ -АТФ-каналів і стресу / Г. Ткаченко, Н. Кургалюк // Вісник Львівського університету. – 2004. – Вип. 38. – С. 178–185.

5. Хара М. Р. Вплив кастрації на холінергічні реакції серця щурів різної статі в умовах розвитку адреналінової міокардіодистрофії / М. Р. Хара // Вісн. наук. досл. – 2004. – № 1. – С. 91–93.

6. Хара М. Р. Динаміка показників гліколізу, ПОЛ та АОС у самців і самок щурів з адреналіновою міокардіодистрофією / М. Р. Хара // Мед. хімія. – 2002. – 4, № 4. – С. 73–75.

7. Effect of training on beta1 beta2 beta3 adrenergic and M2 muscarinic receptors in rat heart / J. Barbier,

F. Rannou-Bekono, J. Marchais [et al.] // Med. Sci. Sports Exerc. – 2004. – **36**, № 6. – P. 949–954.

8. Impact of age and sex on sudden cardiovascular death following myocardial infarction [Electronic source] /

S. Z. Abildstrom, C. Rask-Madsen, M. M. Ottesen [et al.] // Heart. – 2002. – **88**, № 6. – P. 573–578. – Access mode: <http://heart.bmj.com/content/88/6/573.full.pdf>

М. Р. Хара¹, Р. С. Усинский²

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ В. ГНАТЮКА¹
ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. Я. ГОРБАЧЕВСКОГО²

МЕТАБОЛИЗМ АЦЕТИЛХОЛИНА В ПОВРЕЖДЕННОМ АДРЕНАЛИНОМ МИОКАРДЕ САМЦОВ И САМОК КРЫС ПРИ ПРИМЕНЕНИИ БЛОКАТОРА АТФ-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ ГЛИБЕНКЛАМИДА И БЛОКАТОРА КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ ВЕРАПАМИЛА

Резюме

В опытах на половозрелых самцах и самках крыс изучено влияние блокатора АТФ-чувствительных калиевых каналов глибенкламида и блокатора кальциевых каналов верапамила на содержание и интенсивность ферментативного гидролиза ацетилхолина в миокарде предсердий и желудочков при развитии некротического процесса в сердце. Установлено, что глибенкламид не меняет характера динамики содержания ацетилхолина в миокарде самцов при повреждении сердца адреналином, в сердце самок наблюдаются накопление ацетилхолина в миокарде предсердий и уменьшение в миокарде желудочков. Активность ферментативного гидролиза ацетилхолина в этих условиях существенно возрастает, более интенсивные изменения происходят в самцах. Развитие некротического процесса на фоне верапамила сопровождается менее интенсивным снижением содержания ацетилхолина в сердце самцов, несмотря на большую активность его ферментативного гидролиза, а у самок содержание ацетилхолина и активность его расщепления в миокарде предсердий поддерживаются на исходном уровне, тогда как в желудочках уменьшаются несколько интенсивнее на фоне роста активности ферментативного расщепления медиатора.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: некроз миокарда, пол, глибенкламид, верапамил, метаболизм ацетилхолина.

M. R. Khara¹, R. S. Usynskyi²

V. HNATYUK TERNOPIL NATIONAL PEDAGOGICAL UNIVERSITY¹
I. YA. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY²

ACETYLCHOLINE METABOLISM IN EPINEPHRINE-DAMAGED MYOCARD OF MALE AND FEMALE RATS IN USAGE OF ATP-SENSITIVE CHANNELS BLOCKER GLIBENCLAMID AND CALCIUM CHANNELS BLOCKER OF VERAPAMIL

Summary

Action of ATP-sensitive channels blocker glibenclamid and calcium channel blocker verapamil on level and intensity of enzymatic hydrolysis of acetylcholine in atrium and ventricles myocardium in development of necrotic process in the heart were investigated in experiments on eugenic rat males and females. It was established that glibenclamid didn't change character of level dynamics for acetylcholine in male rats myocardium in epinephrine heart damage; in hearts of females acetylcholine level was increased in atrium myocardium and decreased in ventricle myocardium. Intensity of enzymatic hydrolysis of acetylcholine was higher in such conditions, especially in rat males. Development of necrotic process on the verapamil background was associated with less intensive of acetylcholine level in rat males myocardium despite the higher activity of its enzymatic hydrolysis; in rat females acetylcholine level and activity of its desintegration in atrial myocardium were on the baseline level and in ventricles were decreased a bit more intensively with increase of enzymatic desintegration of mediator.

KEY WORDS: myocardium necrosis, sex, glibenclamid, verapamil, acetylcholine metabolism.

Отримано 22.08.12

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

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

З. Я. Федорович, Р. В. Фафула, Е. І. Личковський, З. Д. Воробець
Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

МОДЕЛЮВАННЯ ДИНАМІКИ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННОЇ КОНЦЕНТРАЦІЇ ІОНІВ Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} , H^+ ТА МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦІАЛУ ЛІМФОЦИТІВ

Запропоновано методологічний підхід до дослідження динаміки основних фізико-хімічних параметрів лімфоцитів. Розроблено математичну модель, що імітує транспортування іонів, зміни мембранного потенціалу та рН клітини. Отримана модель включає в себе такі: 1) системи транспортування іонів плазматичної мембрани Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-ази, калієві, натрієві, кальцієві та хлорні канали, Na^+ - Ca^{2+} -, Na^+ - H^+ - і Ca^{2+} - H^+ -обмінники, Na^+ , 2Cl^- , K^+ -котранспортер; 2) залежність мембранного потенціалу від іонів Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} ; 3) залежність мембранного потенціалу від рН клітини. Модельні рівняння одержано з огляду на принцип збереження маси та електронейтральності.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: лімфоцити, транспортування іонів, іонні канали, обмінники, помпи, математичне моделювання.

ВСТУП. Багато динамічних властивостей клітини визначаються завдяки інтегральному функціонуванню клітинних мембранних транспортерів [17]. Одним з таких класичних випадків є генерування різниці електричного потенціалу на плазматичній мембрані тваринної клітини, що є наслідком узгодженого функціонування іонних транспортерів, які здійснюють пасивне та активне транспортування іонів [2]. Математичне представлення такої системи досить складне і зазвичай складається із систем нелінійних диференціальних рівнянь, які описують зміни мембранного потенціалу, клітинного об'єму та рН, деяких внутрішньо- і позаклітинних концентрацій [3, 5, 15, 24]. Такі системи важко проаналізувати, їх вивчення вимагає числової симуляції швидких та/або періодичних змін мембранного потенціалу збудливих і незбудливих клітин [9].

Комплексність таких моделей полягає в тому, що у живих клітинах іонне транспортування через мембрану одночасно впливає як на рН, об'єм клітини, так і на мембранний потенціал [4, 7, 8, 11].

Оскільки за структурним і хімічним складом клітина не перебуває в стані термодинамічної рівноваги, то для підтримання такого стану необхідний постійний притік речовини та енергії, а також відтік продуктів життєдіяльності [6]. Отже, самоорганізацію системи можна ініціювати шляхом зміни її параметрів.

© З. Я. Федорович, Р. В. Фафула, Е. І. Личковський, З. Д. Воробець, 2012.

Як відомо, реакції, які перебігають у клітині, є надзвичайно складними та охоплюють багато проміжних сполук. Математичний опис таких реакцій здійснюють складними системами рівнянь, що не завжди можна розв'язати аналітично. В такому випадку варто застосувати методи числового розв'язування систем рівнянь, а для дослідження "поведінки" моделі можна обмежитись якісною картиною явищ [16].

Головною умовою більшості моделей, які описують активність клітин як про-, так і еукаріотів, є транспортування позитивних іонів калію, кальцію та натрію, а також негативно зарядженого хлору, які впливають на мембранний потенціал [10].

Метою цього дослідження було вивчити роль іонних транспортерів у динамічних властивостях незбудливих клітин, зокрема на прикладі лімфоцитів.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Ми запропонували математичну модель, що описує зміни внутрішньоклітинних концентрацій іонів калію, кальцію, натрію та протона, а також негативно зарядженого хлору, рН та мембранного потенціалу. Разом ці сім фізико-хімічних змінних можуть розширити знання про головні динамічні властивості незбудливих клітин.

Для проведення теоретичного дослідження вивчення ролі іонних транспортерів у динамічних властивостях лімфоцита ми розробили нелінійну динамічну модель транспортування іонів через плазматичну мембрану,

взявши за основу такі головні експериментальні дослідження і спостереження [13, 14, 18–23, 25]:

1. Розподіл іонів між внутрішньоклітинною та позаклітинною сторонами мембрани є асиметричним.

2. Ca^{2+} входить у клітину з Ca^{2+} -депо або ззовні завдяки роботі Ca^{2+} -каналів і транспортується з клітини у позаклітинне середовище за енергозалежними механізмами, а саме: Mg^{2+} -активованою, Ca^{2+} -АТФ-азою та Na^+/H^+ , $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінниками.

3. Гомеостаз Na^+ у лімфоциті підтримується так: Na^+ надходить у клітину пасивно натрієвими каналами та за енергозалежним механізмом (вторинноактивне транспортування), а саме Na^+/H^+ , $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінниками та Na^+ , 2Cl^- , K^+ -котранспортером. Надлишок Na^+ випомпується з клітини Na^+ , K^+ -АТФ-азою.

4. K^+ транспортується з клітини пасивно калієвими каналами й у клітину за первинноактивним механізмом – Na^+ , K^+ -АТФ-азою та вторинноактивно – Na^+ , 2Cl^- , K^+ -котранспортером.

5. Концентрація хлору всередині клітини підтримується в строго визначених межах. Аніони хлору переносяться через мембрану з клітини за допомогою хлорних каналів, а надходять у клітину через механізм вторинного транспортування, а саме Na^+ , 2Cl^- , K^+ -котранспортером.

6. Для нормального функціонування іонотранспортних систем, а як наслідок і самої клітини, необхідне підтримання певного значення внутрішньоклітинного рН. Головними системами, які регулюють гомеостаз іонів H^+ , а отже, і кислотно-лужні зсуви, у клітині є Na^+/H^+ та $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінники.

7. При побудові моделі транспортування іонів через плазматичну мембрану лімфоцита нехтуємо наявністю великого числа типів іонних каналів. Також у моделі не враховано вплив Na^+ -залежного та незалежного $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -обмінників, оскільки їх робота відіграє

несуттєву роль у розподілі іонів. Відомо, що Na^+ -залежний $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -обмінник нейтралізує клітинну ацидифікацію, Na^+ -незалежний $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -обмінник нормалізує алкалізацію клітин. Не враховано також вплив іонотранспортних систем ендоплазматичного ретикула та мітохондрій та іонозв'язувальних білків у підтриманні іонного гомеостазу.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Іонні транспортери, включені у модель, проілюстровано на рисунку. Транспортування іонів між зовнішнім середовищем та внутрішньоклітинним простором регулюється Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-азами, калієвими, натрієвими, кальцієвими та хлорними каналами, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, Na^+/H^+ і $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -обмінниками, Na^+ , 2Cl^- , K^+ -котранспортером.

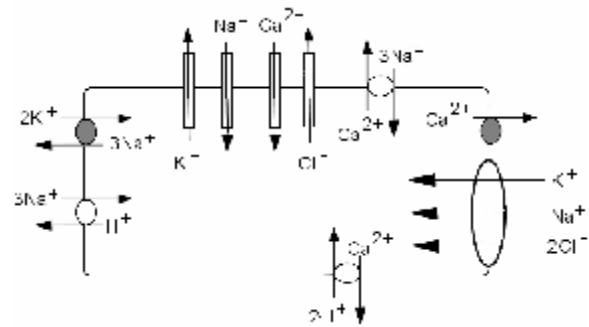


Рис. Схема, що ілюструє головні іонотранспортні системи у лімфоциті. На рисунку зображено напрямки потоку іонів такими системами: Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-ази, калієві, натрієві, кальцієві та хлорні канали, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, Na^+/H^+ і $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -обмінники, Na^+ , 2Cl^- , K^+ -котранспортер.

Математична модель складається зі змінних, а саме: концентрацій іонів Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} та H^+ , рН клітини. Побудова моделі вимагає врахування передусім найістотніших причинно-наслідкових зв'язків і складається з 5 диференціальних рівнянь, що містять зміну в часі концентрацій кожного з 5 типів іонів. Позначення у системі рівнянь k_1 – k_{16} відповідають константам швидкості транспортування іонів білками-переносниками та існуючого електрохімічного потенціалу:

$$\begin{aligned} \frac{d[\text{K}^+]_i}{dt} &= -k_1[\text{K}^+]_i + 2k_5[\text{K}^+]_i[\text{Na}^+]_i + k_{13}[\text{K}^+]_i[\text{Cl}^-]_i \\ \frac{d[\text{Na}^+]_i}{dt} &= k_2[\text{Na}^+]_i - 3k_6[\text{Na}^+]_i[\text{K}^+]_i + 3k_8[\text{Na}^+]_i[\text{Ca}^{2+}]_i + 3k_{10}[\text{Na}^+]_i[\text{H}^+]_i + k_{12}[\text{Na}^+]_i[\text{Cl}^-]_i \\ \frac{d[\text{Ca}^{2+}]_i}{dt} &= k_3[\text{Ca}^{2+}]_i - k_7[\text{Ca}^{2+}]_i - k_9[\text{Na}^+]_i[\text{Ca}^{2+}]_i + k_{15}[\text{Ca}^{2+}]_i[\text{H}^+]_i \\ \frac{d[\text{Cl}^-]_i}{dt} &= -k_4[\text{Cl}^-]_i + k_{14}[\text{K}^+]_i[\text{Cl}^-]_i + k_{14}[\text{Na}^+]_i[\text{Cl}^-]_i \\ \frac{d[\text{H}^+]_i}{dt} &= -k_{11}[\text{Na}^+]_i[\text{H}^+]_i + 2k_{16}[\text{Ca}^{2+}]_i[\text{H}^+]_i \\ pH_i &= -\lg[\text{H}^+]_i, \end{aligned} \quad (1)$$

де $[K^+]_i$, $[Na^+]_i$, $[Ca^{2+}]_i$, $[Cl^-]_i$, $[H^+]_i$ – внутрішньоклітинні концентрації калію, натрію, кальцію, хлору та водню відповідно; k_1 – константа швидкості перенесення іонів калію K^+ -каналом; k_2 – константа швидкості перенесення іонів натрію Na^+ -каналом; k_3 – константа швидкості перенесення іонів кальцію Ca^{2+} -каналом; k_4 – константа швидкості перенесення іонів хлору Cl^- -каналом; k_5 – константа швидкості перенесення іонів калію Na^+ , K^+ -АТФ-азою; k_6 – константа швидкості перенесення іонів натрію Na^+ , K^+ -АТФ-азою; k_7 – константа швидкості перенесення іонів кальцію Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-азою; k_8 – константа швидкості перенесення іонів натрію Na^+ - Ca^{2+} -обмінником; k_9 – константа швидкості перенесення іонів кальцію Na^+ - Ca^{2+} -обмінником; k_{10} – константа швидкості перенесення іонів натрію Na^+ - H^+ -обмінником; k_{11} – константа швидкості перенесення іонів водню Na^+ - H^+ -обмінником; k_{12} – константа швидкості перенесення іонів натрію Na^+ , $2Cl^-$, K^+ -котранспортером; k_{13} – константа швидкості перенесення іонів калію Na^+ , $2Cl^-$, K^+ -котранспортером; k_{14} – константа швидкості перенесення іонів хлору Na^+ , $2Cl^-$, K^+ -котранспортером; k_{15} – константа швидкості перенесення іонів кальцію Ca^{2+} - H^+ -обмінником; k_{16} – константа швидкості перенесення іонів водню Ca^{2+} - H^+ -обмінником.

Константу швидкості перенесення іонів k знаходимо як відношення вхідного чи вихідного потоку до концентрації речовини по тій стороні мембрани, звідки йде речовина. Одиниці вимірювання k – см/с. Оскільки константи

швидкості одностороннього перенесення іонів залежать від трансмембранної різниці електричних потенціалів та коефіцієнта проникності мембрани для даного типу іонів, то вони визначаються таким співвідношенням [2]:

$$k = P_i \frac{zF}{RT} \frac{V_1 - V_2}{1 - \exp\left[\frac{zF}{RT}(V_2 - V_1)\right]}, \quad (2)$$

де R – універсальна газова стала; T – абсолютна температура; F – число Фарадея; $V_1 - V_2$ – різниця мембранного потенціалу; z – валентність іона; P_i – проникність мембрани для іонів i -го типу, см/с.

Оскільки мембрана лімфоцита є проникною для натрію, калію, хлору та кальцію, сумарний іонний струм дорівнює нулю, то у цьому випадку:

$$I_{Na} + I_K + I_{Cl} + I_{Ca} = 0, \quad (3)$$

де I_{Na} , I_K , I_{Cl} , I_{Ca} – струми, створені іонами Na^+ , K^+ , Cl^- та Ca^{2+} відповідно. Отже,

$$0 = \frac{P_{Na} F^2 E_m [Na^+]_i - [Na^+]_o \exp(-FE_m/RT)}{RT} + \frac{P_K F^2 E_m [K^+]_i - [K^+]_o \exp(-FE_m/RT)}{RT} + \frac{P_{Cl} F^2 E_m [Cl^-]_o - [Cl^-]_i \exp(-FE_m/RT)}{RT} + \frac{4P_{Ca} F^2 E_m [Ca^{2+}]_i - [Ca^{2+}]_o \exp(-2FE_m/RT)}{RT} \quad (4)$$

З рівняння (4) визначаємо величину мембранного потенціалу:

$$E_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{4 \frac{1 - \exp(-E_m F / RT)}{1 - \exp(-2E_m F / RT)} P_{Ca} [Ca^{2+}]_o \exp(-2E_m F / RT) + P_K [K^+]_o + P_{Na} [Na^+]_o + P_{Cl} [Cl^-]_i}{4 \frac{1 - \exp(-E_m F / RT)}{1 - \exp(-2E_m F / RT)} P_{Ca} [Ca^{2+}]_i + P_K [K^+]_i + P_{Na} [Na^+]_i + P_{Cl} [Cl^-]_o}.$$

Якщо позначити вираз $\frac{1 - \exp(-E_m F / RT)}{1 - \exp(-2E_m F / RT)}$ як α і $\alpha = \frac{1 - \exp(-E_m F / RT)}{1 - \exp(-2E_m F / RT)}$,

то рівняння, що описує величину мембранного потенціалу, буде таким:

$$E_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{4\alpha P_{Ca} [Ca^{2+}]_o \exp(-2E_m F / RT) + P_K [K^+]_o + P_{Na} [Na^+]_o + P_{Cl} [Cl^-]_i}{4\alpha P_{Ca} [Ca^{2+}]_i + P_K [K^+]_i + P_{Na} [Na^+]_i + P_{Cl} [Cl^-]_o}, \quad (5)$$

де $[Ca^{2+}]_i$ і $[Ca^{2+}]_o$ – концентрація кальцію, $[K^+]_i$ і $[K^+]_o$ – концентрація калію, $[Na^+]_i$ і $[Na^+]_o$ – концентрація натрію, $[Cl^-]_i$ і $[Cl^-]_o$ – концентрація хлору у внутрішньо- і позаклітинному середовищі відповідно; E_m – мембранний потенціал; P_{Ca} , P_K , P_{Na} і P_{Cl} – коефіцієнти проникності мембрани для іонів кальцію, калію, натрію і хлору.

Формула (5) є модифікованим рівнянням Гольдмана-Ходжкіна-Катца, що описує мембранний потенціал, створений одно- та дво-валентними іонами.

Як відомо, значення коефіцієнтів проникності мембрани є величиною змінною, вона залежить як від величини мембранного потенціалу, так і від концентрації іонів [12], тому рівняння (5) модифікуємо, виходячи з рівняння (3) і виконавши такі умови:

1. За умови рівності нулю іонного струму для хлору та кальцію, $I_{Na} = -I_K$:

$$\frac{P_{Na}}{P_K} = \frac{[K^+]_o \exp\left(-\frac{FE_m}{RT}\right) - [K^+]_i}{[Na^+]_i - [Na^+]_o \exp\left(-\frac{FE_m}{RT}\right)}. \quad (6)$$

2. За умови рівності нулю іонного струму для натрію та кальцію, $I_{Cl} = -I_K$:

$$\frac{P_{Cl}}{P_K} = \frac{[K^+]_o \exp\left(-\frac{FE_m}{RT}\right) - [K^+]_i}{[Cl^-]_o - [Cl^-]_i \exp\left(-\frac{FE_m}{RT}\right)}. \quad (7)$$

3. За умови рівності нулю іонного струму для хлору та натрію, $I_{Ca} = -I_K$:

$$\frac{P_{Ca}}{P_K} = - \frac{[K^+]_i - [K^+]_o \exp\left(-\frac{FE_m}{RT}\right) \cdot \left[1 - \exp\left(-\frac{2FE_m}{RT}\right)\right]}{\left[1 - \exp\left(-\frac{FE_m}{RT}\right)\right] \left[[Ca^{2+}]_i - [Ca^{2+}]_o \exp\left(-\frac{2FE_m}{RT}\right) \right]}. \quad (8)$$

Отже, рівняння, що дозволяє обчислити мембранний потенціал лімфоцита, має такий вигляд:

$$E_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{4\alpha \frac{P_{Ca}}{P_K} [Ca^{2+}]_o \exp(-2E_m F / RT) + [K^+]_o + \frac{P_{Na}}{P_K} [Na^+]_o + \frac{P_{Cl}}{P_K} [Cl^-]_i}{4\alpha \frac{P_{Ca}}{P_K} [Ca^{2+}]_i + [K^+]_i + \frac{P_{Na}}{P_K} [Na^+]_i + \frac{P_{Cl}}{P_K} [Cl^-]_o}. \quad (9)$$

Запропонована математична модель (1–9) дозволяє дослідити розподіл іонів, трансмембранний потенціал та pH лімфоцита.

ВИСНОВКИ. Кожна з перерахованих іоно-транспортних систем робить свій внесок в утворення і підтримку концентраційних

градієнтів іонів на плазматичній мембрані лімфоцита, утворюючи мембранний потенціал. Отримана система рівнянь дає змогу розрахувати концентрації головних іонів (натрію, калію, кальцію, хлору, водню), pH всередині клітини і потенціал спокою на мембрані лімфоцита.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Антонов В. Ф. Мембранный транспорт / В. Ф. Антонов // Соросовский образовательный журнал. – 1997. – № 6. – С. 14–20.
2. Веренинов А. А. Транспорт ионов через клеточную мембрану. Анализ потоков / А. А. Веренинов. – Л.: Наука, 1978. – 286 с.
3. Волобуев А. Н. Моделирование ионного транспорта в биомембранах / А. Н. Волобуев // Математическое моделирование. – 2004. – **16**, № 3. – С. 78–86.
4. Дика М. В. Дослідження динаміки мембранозв'язаних біоелектричних процесів ембріональних клітин з використанням комп'ютерного моделювання: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук / М. В. Дика. – Львів, 2001. – 19 с.
5. Лахно В. Д. Математическая клетка. Концепции построения математических моделей переноса заряда в живой клетке / В. Д. Лахно // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Прикладная и компьютерная математика. – 2003. – **2**, № 2. – С. 77–84.
6. Николис Т. Познание сложного / Т. Николис, И. Пригожин. – М.: Мир, 1992. – 336 с.
7. Федорович З. Я. Перерозподіл потенціал-генеруючих іонів Na^+ , K^+ , Cl^- та Ca^{2+} в ранньому ембріогенезі холоднокровних: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук / З. Я. Федорович. – Львів, 2010. – 22 с.

8. A compartmental model analysis of integrative and self-regulatory ion dynamics in pollen tube growth / J. Liu, B. M. A. G. Piette, M. J. Deeks [et al.] // PLoS One. – 2010. – **5**, № 10. – P. 1–15.
9. A mathematical model of fluid secretion from a parotid acinar cell / E. Gina, E. J. Crampin, D. A. Brown [et al.] // J. Theor. Biol. – 2007. – **7**, № 248 (1). – P. 64–80.
10. A theory for the membrane potential of living cells / L. P. Endresen, K. Hall, J. S. Høye [et al.] // Biological Physics. – 1998. – P. 1–22.
11. Biophysically based mathematical modeling of interstitial cells of cajal slow wave activity generated from a discrete unitary potential basis / R. A. Faville, A. J. Pullan, K. M. Sanders [et al.] // Biophys. J. – 2009. – **96**. – P. 4834–4852.
12. Calumin, a Ca^{2+} -binding protein on the endoplasmic reticulum, alters the ion permeability of Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} (CRAC) channels / M. Konno, H. Shirakawa, T. Miyake [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2012. – **417**, № 2. – P. 784–789.
13. Counillon L. The expanding family of eucaryotic Na^+/H^+ exchangers / L. Counillon, J. Pouyssegur // J. Biol. Chem. – 2000. – **275**, № 7. – P. 1–4.
14. Fischer K. G. Characterization of a Na^+-Ca^{2+} exchanger in podocytes / K. G. Fischer, N. Jonas, F. Poschenrieder // Nephrology Dialysis Transplantation. – 2002. – **17**. – P. 1742–1750.

15. Gedde M. M. Membrane potential and human erythrocyte shape / M. M. Gedde, W. H. Huestis // *Biophys. J.* – 1997. – **72**. – P. 1220–1233.
16. Higgins J. P. Nonlinear Systems in Medicine / J. P. Higgins // *Yale J. Biol. Med.* – 2002. – **75**. – P. 247–260.
17. Hoffmann E. K. Physiology of cell volume regulation in vertebrates / E. K. Hoffmann, I. H. Lambert, S. F. Pedersen // *Physiol. Rev.* – 2009. – **89**. – P. 193–277.
18. Koksoy A. A. Na^+ , K^+ -ATPase / A. A. Koksoy // *A review journal of Ankara medical school.* – 2002. – **24**, № 2. – P. 73–82.
19. Kurtz I. Na^+ -independent $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange in Madin-Darby canine kidney cells. Role in intracellular pH regulation / I. Kurtz, K. Golchini // *J. Biol. Chem.* – 1987. – **262**, № 10. – P. 4516–4520.
20. Modulation of Kv channel expression and function by TCR and costimulatory signals during peripheral CD4⁺ lymphocyte differentiation / Q. H. Liu, B. K. Fleischmann, B. Hondowicz [et al.] // *J. Exp. Med.* – 2002. – **196**. – P. 897–909.
21. Phipps D. J. Chloride-channel block inhibits T lymphocyte activation and signaling / D. J. Phipps, D. R. Branch, L. C. Schlichter // *Cell Signal.* – 1996. – **8**. – P. 141–149.
22. Pre-steady state electrogenic events of $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ exchange and transport by the Ca^{2+} -ATPase / F. Tadini-Buoninsegni, G. Bartolommei, M. R. Moncelli [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2006. – **281**, № 49. – P. 37720–37727.
23. Role of chloride/bicarbonate antiport in the control of cytosolic pH. Cell-line differences in activity and regulation of antiport / K. Reinertsen, T. Tonnessen, J. Jacobsen [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1988. – **263**, № 23. – P. 11117–11125.
24. Rybak S. L. Theoretical considerations on the role of membrane potential in the regulation of endosomal pH / S. L. Rybak, F. Lanni, R. F. Murphy // *Biophys. J.* – 1997. – **73**. – P. 674–687.
25. Voltage gated potassium channel in human T lymphocytes / M. D. Cahalan, K. G. Chandy, T. E. De Coursey [et al.] // *J. Physiol.* – 1985. – **358**. – P. 197–237.

З. Я. Федорович, Р. В. Фафула, Е. И. Личковский, З. Д. Воробец
ЛЬВОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ДАНИЛА ГАЛИЦКОГО

МОДЕЛИРОВАНИЕ ДИНАМИКИ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ ИОНОВ Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} , H^+ И МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА ЛИМФОЦИТОВ

Резюме

Предложен методологический подход к исследованию динамики основных физико-химических параметров лимфоцитов. Разработана математическая модель, имитирующая транспортировку ионов, изменения мембранного потенциала и pH клетки. Полученная модель включает в себя следующее: 1) системы транспортировки ионов плазматической мембраны Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-азы, калиевые, натриевые, кальциевые и хлорные каналы, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, Na^+/H^+ и $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -обменники, Na^+ , 2Cl^- , K^+ -котранспортер; 2) зависимость мембранного потенциала от ионов Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} ; 3) зависимость мембранного потенциала от pH клетки. Модельные уравнения получены с точки зрения принципа сохранения массы и электронеutrальности.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: лимфоциты, транспортировка ионов, ионные каналы, обменники, помпы, математическое моделирование.

Z. Ya. Fedorovich, R. V. Fafula, E. I. Lychkovskyi, Z. D. Vorobets
DANYLO HALYTSKYI LVIV NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY

MODELING OF DYNAMICS OF INTERNAL Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} , H^+ IONS CONCENTRATION AND MEMBRANE POTENTIAL OF LYMPHOCYTE

Summary

A methodological approach to study of the dynamics of the basic physical and chemical parameters of lymphocytes was suggested. The mathematical model that simulates the ions transport, changes in membrane potential and cell pH was created. The model includes 1) ion transporting system of plasma membrane Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP-ase, potassium, sodium, calcium and chloride channels, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, Na^+/H^+ and $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -exchangers, Na^+ , 2Cl^- , K^+ -cotransporter; 2) the dependence of membrane potential on Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} ions; 3) membrane potential dependence on cell pH. Model equations derived in terms of the principle of conservation of mass and electroneutrality.

KEY WORDS: lymphocytes, ions transport, ion channels, exchangers, pumps, mathematical modeling.

Отримано 11.07.12

Адреса для листування: Р. В. Фафула, Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, вул. Пекарська, 69, Львів, 79010, Україна, e-mail: roman_fafula@ukr.net.

**ВПЛИВ ЗАМІСНОЇ ТЕРАПІЇ НА СТАН МІНЕРАЛЬНОГО СКЛАДУ КІСТОК
ВЕРХНЬОЇ ТА НИЖНЬОЇ ЩЕЛЕПИ У ГОНАДЕКТОМОВАНИХ САМЦІВ
І САМИЦЬ ЩУРІВ**

В експериментах на статевозрілих щурах різної статі було вивчено вплив гонадектомії на стан мінерального складу кісток верхньої та нижньої щелепи, терапевтичну ефективність замісної гормонотерапії (ЗГТ), Ca з вітаміном D, поєднання ЗГТ та Ca з вітаміном D. Дані оцінювали за вмістом органічних та неорганічних речовин (Ca, P, Mg, Mn, Fe, Cu). Тварин спостерігали через 4 та 8 тижнів після двобічної гонадектомії. Встановили, що через 8 тижнів після двобічного видалення гонад зменшувався вміст неорганічних речовин у кістках верхньої та нижньої щелепи, особливо в самок щурів. Це відбувалося більшою мірою за рахунок втрати Ca та P. ЗГТ (самці – тестостерон, самки – естрадіол/прогестерон) у самців сприяла збереженню частки неорганічних речовин у кістках, а в самок не була достатньо ефективною. Згодовування тваринам Ca з вітаміном D₃ також не забезпечило відновлення мінерального складу кісток у тварин обох статей і було менш ефективним у самок порівняно з самцями. Комбінація ЗГТ та Ca з вітаміном D₃ сприяла збереженню частки неорганічних речовин у складі кісток верхньої та нижньої щелепи лише у гонадектомованих самців. Гонадектомія викликає демінералізацію кісток верхньої та нижньої щелепи. За інтенсивністю щодо збереження мінерального складу кісток переважає комбінація ЗГТ та Ca з вітаміном D₃. Чутливішими до гормонального дисбалансу та менш чутливими до застосовуваної терапії є самки.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: гонадектомія, стать, кістки щелепи, корекція.

ВСТУП. Проблема захворювань пародонта є однією з провідних у сучасній стоматології, що пов'язано зі значним поширенням їх у людей різного віку, відсутністю методів донозологічної діагностики та ефективних заходів профілактики і лікування [5, 7,]. Етіологія та патогенез захворювань пародонта є складними і досі недостатньо з'ясованими. Внаслідок порушення кісткового метаболізму альвеолярного відростка прискорюються процеси його резорбції. Розбалансування ремоделювання зумовлене дією як місцевих регуляторних чинників, зокрема цитокінів, метаболітів арахідонової кислоти [1, 2], так і системних гормональних. Альвеолярний відросток виконує опорну функцію тканин пародонта і водночас як складова частина кісткової системи організму є резервним депо мінералів. Метаболізм кісткової тканини альвеолярного відростка реагує на гормональні зміни в організмі людини, рівень кальцію в крові та інші екзо- й ендогенні чинники, що впливають на кісткову систему. Вивченню механізмів розвитку, методів профілактики та лікування хвороб пародонта, які тісно пов'язані з порушен-

ням структурно-функціонального стану кісткової тканини скелета, присвячено велику кількість праць [4, 11]. В дослідженнях останніх років велику увагу приділяють взаємозв'язку остеопорозу з хворобами пародонта у жінок постменопаузального періоду [3, 10]. З настанням фізіологічної менопаузи дефіцит естрогенів зумовлює зменшення щільності кісток та прогресування дистрофічно-деструктивних змін тканин пародонта [5, 11]. У літературі недостатньо висвітлено питання щодо впливу метаболічних порушень кісткової тканини на перебіг захворювань пародонта [2, 6, 9]. Актуальність напрямку зумовлена тим, що остеопороз та захворювання тканин пародонта – поширені захворювання, які прогресують з віком [3]. Дослідження, які б відображали статеві відмінності стану вищезазначених структур за умов гормонального дисбалансу, в доступних джерелах не численні й не охоплюють весь спектр знань з даної проблеми. Відсутні також комплексні дослідження ефективності різних видів корекції на стан щелепних кісток залежно від статі й гормонопродукучої функції гонад, отримання таких даних може стати підґрунтям для поліпшення методів

лікування та профілактики захворювань пародонта.

Метою дослідження було вивчити вплив різних видів замісної терапії на стан мінерального складу кісток верхньої та нижньої щелепи у гонадектомованих самців і самок щурів.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди провели на 59 гонадектомованих (ГЕ) самцях (♂) і 59 ГЕ самках (♀) статевозрілих нелінійних білих щурів, яких утримували на звичайному раціоні віварію. Двобічну гонадектомію та виведення тварин з експерименту проводили з використанням тіопенталового наркозу. Тварин спостерігали через 4 та 8 тижнів після видалення гонад. У кістках верхньої та нижньої щелепи вивчали вміст Ca, P, Cu, Mg, Mn, Fe, неорганічних та органічних речовин. Дослідження хімічного складу кісток здійснювали шляхом висушування їх до постійної маси в сушильній шафі при $t=105^{\circ}\text{C}$. Висушену кістку спопеляли у фарфорових тиглях у муфельній печі при $t=450\text{--}500^{\circ}\text{C}$ до білого кольору. За масою попелу визначали загальну кількість мінеральних речовин. Різниця маси сухої кістки та попелу свідчила про частку неорганічних речовин. Зважений попіл насипали у пробірки із щільно притертими корками. 10 мг попелу розчиняли в 1 мл 0,5 % розчину соляної кислоти, доводили до 10 мл бідистильованою водою і визначали вміст макро- та мікроелементів на атомно-сорбційному спектрофотометрі C-115 (модернізований "Sumy Electron Optics") [8]. Усіх тварин поділили на 5 груп: 1-ша – контрольні ♀ та ♂; 2-га – ГЕ ♀ та ГЕ ♂; 3-тя – ГЕ ♀ та ГЕ ♂, які отримували замісну гормонотерапію (ЗГТ: ♀ – синестрол 0,1 мг/кг та прогестерон 0,5 мг/щура щоденно в черевну порожнину; ♂ – тестостерон 2 мг/кг у черевну порожнину); 4-та – ГЕ ♀ та ♂, яким вводили щоденно внутрішньошлунково кальцій- D_3 нікомед (Ca-D_3 – 8,33 мг/д); 5-та – ГЕ ♀ та ♂, які отримували ЗГТ+ Ca-D_3 . Усі види корекції починали з наступного дня після гонадектомії і проводили щоденно протягом 8 тижнів. Експерименти виконували з дотриманням принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей, ухвалених на Першому національному конгресі з біоетики (Київ, 2001).

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Отримані результати показали, що незалежно від статі гонадектомія викликала зменшення вмісту неорганічних речовин у кістках верхньої та

нижньої щелепи. Достовірні зміни реєстрували через 8 тижнів спостереження, вони були суттєвішими в самиць (табл. 1). Так, у ГЕ ♂ дефіцит в кістці верхньої щелепи склав 1,2 %, нижньої – 1,1 %, в ГЕ ♀ – 1,4 та 1,7 % відповідно. Частка органічної складової кісток зростала в ГЕ ♂, відповідно, на 2,2 та 2,7 %, а в ГЕ ♀ – на 2,9 та 2,3 %. За змодельованих умов відбувалася втрата кістками макро- та мікроелементів (табл. 2). Зокрема, спостерігали достовірне та наростаюче від 4-го до 8-го тижня спостереження зменшення вмісту Ca та P. Зважаючи на їх вміст у кістках, які є головним депо цих макроелементів, закономірними були більш інтенсивні зміни в ГЕ ♀. Так, у кістці верхньої щелепи ГЕ ♀ через 8 тижнів після видалення гонад дефіцит Ca склав 16,5 %, в ГЕ ♂ – 16,0 %, P – 11,9 та 9,3 % відповідно. Дефіцит Ca та P в кістці нижньої щелепи ГЕ ♀ становив 16,1 та 11,5 %, ГЕ ♂ – 15,5 та 9,3 % відповідно.

Втрата мікроелементів була не такою інтенсивною. Так, зменшення вмісту Cu і Mn у кістці верхньої щелепи ГЕ ♀ склало, відповідно, 6,9 та 3,5 %, а в ГЕ ♂ – 10,1 та 2,4 %. В кістці нижньої щелепи аналогічна закономірність у ГЕ ♀ становила, відповідно, 6,9 та 3,8 %, в ГЕ ♂ – 10 та 3,4 %. Ці дані демонструють суттєву реакцію досліджуваних кісток на тривалий дефіцит статевих гормонів та значну роль як естрогенів, так і андрогенів у підтриманні їх мінерального гомеостазу.

Для відновлення гормонального дисбалансу, викликаного гонадектомією, у наступній серії експериментів було використано тварин, які, починаючи з наступного дня після гонадектомії, щоденно отримували ЗГТ. Варто зазначити, що застосування ЗГТ сприяло кращому збереженню частки мінеральних речовин у досліджуваних кістках. Разом із тим, ЗГТ не була достатньо ефективною для відновлення вмісту Ca та P у тварин обох статей. Це підтверджувалося меншим, ніж у контрольних тварин, вмістом Ca та P у кістках верхньої і нижньої щелепи ГЕ ♀, що склало, відповідно, 6,8, 6,4, 4,9 та 2,2 %, а в ГЕ ♂ – 4,5, 4,4, 2,2 та 2,2 %. Дефіцит Mn за даного виду корекції спостерігали лише у кістках щелепи ГЕ ♀. Зменшення вмісту Cu незначною мірою відзначали в кістці верхньої щелепи ГЕ ♂.

Застосування препарату кальцію з вітаміном D_3 також не продемонструвало достатнього терапевтичного ефекту. В кістках верхньої і нижньої щелепи ГЕ ♀ вміст Ca був менший на 7,1 та 7,0 %, P – на 2,5 та 2,3 %, в ГЕ ♂ – на 4,6, 4,3, 2,3 та 2,1 % відповідно (табл. 2). Серед мікроелементів за даного виду

Таблиця 1 – Вміст органічних та неорганічних речовин у кістках щелеп гонадектомованих щурів за різних коригувальних впливів ($M \pm m$)

Показник		Група тварин				
		К (n=8)	ГЕ 8 тиж. (n=9)	ЗГТ 8 тиж. (n=6)	Ca-D ₃ 8 тиж. (n=6)	Ca-D ₃ +ЗГТ 8 тиж. (n=6)
Кістка верхньої щелепи						
Орг. речовини, %	♂	35,09±0,16	35,87±0,07*	34,99±0,16	35,87±0,07*	34,99±0,16
	♀	35,02±0,09	36,02±0,08*	34,95±0,11	36,02±0,08*	34,95±0,16
Неорг. речовини, %	♂	64,79±0,08	64,02±0,12*	64,42±0,15	64,02±0,13*	64,80±0,16
	♀	64,84±0,02	63,90±0,12*	64,44±0,10*	63,90±0,12*	64,44±0,16*
Кістка нижньої щелепи						
Орг. речовини, %	♂	35,04±0,09	36,00±0,14*	34,95±0,16	34,95±0,16	34,99±0,16
	♀	35,03±0,07	35,84±0,14*	34,95±0,16	34,95±0,16	34,99±0,16
Неорг. речовини, %	♂	64,37±0,10	63,67±0,10*	64,43±0,16	63,66±0,16*	64,46±0,16
	♀	64,25±0,07	63,14±0,11*	63,75±0,12*#	63,70±0,11*	63,25±0,06*#

Примітка. Тут і в наступній таблиці: * – достовірна відмінність показників у межах однієї статі ($p < 0,05$); # – достовірна відмінність показників у тварин різної статі ($p < 0,05$).

Таблиця 2 – Мінеральний склад кісток щелеп гонадектомованих щурів за різних коригувальних впливів ($M \pm m$)

Показник		Група тварин				
		К (n=8)	ГЕ 8 тиж. (n=9)	ЗГТ 8 тиж. (n=6)	Ca-D ₃ 8 тиж. (n=6)	Ca-D ₃ +ЗГТ 8 тиж. (n=6)
Кістка верхньої щелепи						
Ca, % на сух. залишок	♂	37,57±0,12	31,56±0,11 *	35,89±0,09 *#	35,84±0,06 *#	36,34±0,07*#
	♀	37,56±0,05	31,38±0,10*	34,99±0,06 *	34,88±0,08 *	35,84±0,04*
P, % на сух. залишок	♂	17,03±0,04	15,45±0,03*#	16,66±0,02#	16,64±0,02	16,94±0,01#
	♀	17,10±0,02	15,07±0,02 *	16,26±0,02*	16,67±0,02*	16,77±0,04*
Cu, мг	♂	21,31±0,01	19,15±0,19*#	21,13±0,08*	21,13±0,08	21,24±0,03
	♀	21,33±0,04	19,85±0,03*	21,14±0,08	21,14±0,08	21,24±0,03
Mg, мг	♂	4,10±0,01	4,66±0,04*	4,26±0,01*#	4,27±0,01*#	4,12±0,01
	♀	4,11±0,01	4,65±0,09*	4,22±0,01*	4,19±0,01*	4,16±0,02
Mn, % на сух. залишок	♂	12,68±0,02	12,38±0,09*	12,64±0,02*#	12,63±0,02*#	12,64±0,02
	♀	12,70±0,04	12,26±0,12*	12,55±0,02	12,53±0,02	12,59±0,02
Fe, мг	♂	0,94±0,01	0,97±0,01	0,96±0,02	0,96±0,02	0,95±0,01
	♀	0,95±0,01	0,97±0,04	0,90±0,02	0,95±0,02	0,94±0,01
Кістка нижньої щелепи						
Ca, % на сух. залишок	♂	37,50±0,05	31,68±0,15*#	35,85±0,16*#	35,87±0,16*#	36,84±0,16*#
	♀	37,63±0,09	31,57±0,01*	35,02±0,32	35,01±0,32*	35,88±0,16*
P, % на сух. залишок	♂	17,03±0,04	15,45±0,01*#	16,66±0,02	16,67±0,02	16,87±0,04*#
	♀	17,03±0,02	15,07±0,02 *	16,66±0,02	16,64±0,02	16,69±0,04
Cu, мг	♂	21,28±0,06	19,15±0,19*#	21,15±0,01	21,16±0,01	21,23±0,01
	♀	21,29±0,03	19,82±0,04 *	21,11±0,08	21,11±0,08	21,16±0,03
Mg, мг	♂	4,11±0,01	4,66±0,04 *	4,22±0,01*#	4,19±0,01*#	4,16±0,01*
	♀	4,10±0,01	4,59±0,12*	4,26±0,01*	4,27±0,01*	4,19±0,01*
Mn, % на сух. залишок	♂	12,69±0,03	12,26±0,03*	12,65±0,02	12,64±0,02	12,66±0,02
	♀	12,68±0,03	12,20±0,04*	12,55±0,03	12,53±0,02	12,59±0,02
Fe, мг	♂	0,96±0,03	0,98±0,03	0,96±0,03	0,96±0,04	0,96±0,01
	♀	0,94±0,01	0,97±0,04	0,95±0,02	0,95±0,02	0,94±0,01

терапії спостерігали лише дефіцит Cu, що в кістках верхньої і нижньої щелеп склав, відповідно, 1,3 та 1,2 %. Отримані дані свідчать про те, що замісна терапія препаратом кальцію з вітаміном D₃ також не була достатньо ефек-

тивною щодо збереження мінеральної частки кістки в ГЕ тварин, що підтверджує функціональне значення статевих стероїдів у підтриманні мінерального гомеостазу даної тканини.

Однчасне застосування ЗГТ та препарату кальцію з вітаміном D найбільш повно сприяло збереженню частки мінеральних речовин у кістках щелеп ГЕ тварин. За такого виду корекції дефіцит Са та Р у кістках верхньої і нижньої щелеп ГЕ ♀ становив, відповідно, 4,6, 4,7, 1,9 та 2,0 %, а в ГЕ ♂ – 3,3, 1,8, 0,5 та 0,9 %. Окрім цього, у ГЕ ♀ спостерігали незначний дефіцит Си та Мп. Хоча даний вид терапії суттєвіше за інші сприяв підтриманню мінерального складу кісток верхньої та нижньої щелеп як ГЕ ♂, так і ГЕ ♀, проте його ефективність у ГЕ ♀ була меншою, що, ймовірно, було наслідком нездатності екзогенно введених статевих стероїдів реалізувати притаманні їм ефекти за умов відсутності циклічної активності яєчників та порушення механізму зворотного зв'язку, що

є основою функціонування ендокринної системи.

ВИСНОВОК. У результаті проведеного експерименту можна стверджувати, що дефіцит статевих гормонів (естрогенів у самиць та андрогенів у самців) призводить до зменшення вмісту макро- та мікроелементів у кістках верхньої і нижньої щелеп, більшою мірою в гонадектомованих самиць. Застосування комбінованої терапії (замісна гормонотерапія та препарат кальцію з вітаміном D) краще, ніж окреме використання ЗГТ чи препарату кальцію, забезпечує збереження мінерального складу кісток верхньої і нижньої щелеп. Ефективність комбінованої терапії в самиць є меншою, ніж у самців.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Білець М. В. Зміни мінеральної фази кісткової тканини в умовах сполученої дії емоційного стресу і недостатності гонад / М. В. Білець // Клін. та експерим. патол. – 2004. – **3**, № 2. – С. 332–333.
2. Горбачева И. А. Общесоматические аспекты патогенеза и лечения генерализованного пародонтита / И. А. Горбачева, А. И. Кирсанов, Л. Д. Чехова // Стоматология. – 2001. – № 1. – С. 26–34.
3. Жилкин Б. А. Морфологическая характеристика минеральной фазы кости в норме, при старении и остеопорозе : автореф. дис. на соискание ученой степени канд. мед. наук / Б. А. Жилкин. – М., 2000. – 28 с.
4. Максимовский Ю. М. Состояние пародонта при генерализованном остеопорозе у женщин с недостаточностью функции яичников / Ю. М. Максимовский, А. И. Мошкуль, В. Е. Новиков // Стоматология. – 1991. – № 1. – С. 24–26.
5. Машенко И. С. Оценка остеопоротического процесса в альвеолярной кости // Вісник стоматології. – 2002. – № 2. – С. 20–24.
6. Салихова М. М. Применение кальцитрина в комплексном лечении пародонтита / М. М. Салихова // Стоматология. – 1991. – № 3. – С. 17–19.
7. Тарасенко Л. М. Зміни метаболізму протеогліканів у кістковій тканині різних відділів скелету за умов емоційного стресу, недостатності функцій гонад та їх сполученого впливу / Л. М. Тарасенко, М. В. Білець // Матеріали IX Українського біохімічного з'їзду, 24–27 жовтня 2006 р., м. Харків.
8. Хавезов И. Атомно-абсорбционный анализ / И. Хавезов, Д. Цалев ; пер. с болг. – Л. : Медицина, 1983. – 144 с.
9. Cefalu, C. A. Osteoporosis in men / C. A. Cefalu // Am. Fam. Physician. – 2001. – **63** (12). – P. 2331–2332.
10. Longitudinal alveolar bone loss in postmenopausal osteoporotic/osteopenic women / J. B. Payne, R. A. Reinhardt, P. V. Nummikoski, K. D. Patil // Osteoporos Int. – 1999. – **10**. – P. 34–40.
11. Osteoporosis in men: a potential role for the sex hormone binding globulin / E. Legrand, C. Hedde, Y. Gallois [et al.] // Bone. – 2001. – **29** (1). – P. 90–95.

М. Р. Хара¹, С. А. Росоловская²

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ В. ГНАТЮКА¹
 ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. Я. ГОРБАЧЕВСКОГО²

ВЛИЯНИЕ ЗАМЕСТИТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ НА СОСТОЯНИЕ МИНЕРАЛЬНОГО СОСТАВА КОСТЕЙ ВЕРХНЕЙ И НИЖНЕЙ ЧЕЛЮСТЕЙ В ГОНАДЕКТОМИРОВАННЫХ САМЦОВ И САМОК КРЫС

Резюме

В экспериментах на половозрелых крысах обоих полов было изучено влияние гонадектомии на состояние минерального состава костей верхней и нижней челюстей, терапевтическую эффективность заместительной

гормонотерапии (ЗГТ), Ca с витамином D, сочетание ЗГТ и Ca с витамином D. Данные оценивали по содержанию органических и неорганических веществ (Ca, P, Mg, Mn, Fe, Cu). Животных наблюдали через 4 и 8 недель после двусторонней гонадэктомии. Установили, что через 8 недель после удаления гонад с обеих сторон уменьшалось содержание неорганических веществ в костях верхней и нижней челюстей, особенно у самок крыс. Это происходило в большей степени за счет потери Ca и P. ЗГТ (самцы – тестостерон, самки – эстрадиол/прогестерон) у самцов способствовала сохранению доли неорганических веществ в костях, а у самок не была достаточно эффективной. Скармливание животным Ca с витамином D₃ также не обеспечило восстановления минерального состава костей у животных обоих полов и было менее эффективным у самок по сравнению с самцами. Комбинация ЗГТ и Ca с витамином D₃ способствовала сохранению доли неорганических веществ в составе костей верхней и нижней челюстей только в гонадэктомированных самцов. Гонадэктомия вызывает деминерализацию костей верхней и нижней челюстей. По интенсивности относительно сохранения минерального состава костей преобладает сочетание ЗГТ и Ca с витамином D₃. Более чувствительными к гормональному дисбалансу и менее чувствительными к применяемой терапии являются самки.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гонадэктомия, пол, кости челюсти, коррекция.

M. R. Khara¹, S. O. Rosolovska²

V. HNATYUK TERNOPIL NATIONAL PEDAGOGICAL UNIVERSITY¹
I. YA. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY²

EFFECT OF REPLACEMENT THERAPY ON THE STATE OF MINERAL BONES COMPOSITION OF THE UPPER AND LOWER JAWS IN GONADECTOMIZED MALE AND FEMALE RATS

Summary

The influence of gonadectomy on the state of the mineral composition of bones of the upper and lower jaws, therapeutic effectiveness of hormone-replacement therapy (HRT), Ca with vitamin D, the combination of HRT and Ca with vitamin D were studied on experiments on mature rats of both sexes. The evaluation of data was held by the content of organic and inorganic substances (Ca, P, Mg, Mn, Fe, Cu). Animals were observed after 4 and 8 weeks after bilateral gonadectomy. It was established that after 8 weeks after bilateral removing of the gonads the amount of inorganic substances in the bones of the upper and lower jaws decreases, especially in female rats. This was mostly due to loss of Ca and P. HRT (males – testosterone, females – estradiol / progesterone) in males contributed to the preservation of percentage of inorganic matter in the bones, and in females it was not sufficiently effective. Feeding animals with Ca vitamin. D₃ also did not ensure restoration of bone mineral content in animals of both sexes and was less effective in females compared with males. The combination of HRT and Ca with vitamin. D₃ contributed to the preservation of percentage of inorganic substances within the bones of the upper and lower jaws only gonadectomic males. Gonadectomy causes bone demineralization of upper and lower jaws. According to the intensity of preservation of bone mineral composition dominated by a combination of HRT and Ca with vitamin. D₃. Sensitive to hormonal imbalance and less sensitive to the applied therapy are female rats.

KEY WORDS: gonadectomy, sex, bone mineral content of the upper and lower jaws.

Отримано 20.06.12

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

ВИВЧЕННЯ УМОВ ЕКСТРАКЦІЇ АГОМЕЛАТИНУ ОРГАНІЧНИМИ РОЗЧИННИКАМИ

*Вивчено ефективність екстракції агомелатину хлороформом, 1,2-дихлоретаном, гексаном та сумішшю розчинників хлороформ–бутанол (1:1) із водних розчинів при різних значеннях рН середовища. Запропоновано методику кількісного визначення агомелатину на основі реакції з *n*-диметиламінобензальдегідом у середовищі концентрованої сульфатної кислоти. Результати досліджень можуть бути використані при хіміко-токсикологічному аналізі агомелатину.*

КЛЮЧОВІ СЛОВА: агомелатин, екстракція, кількісне визначення, хіміко-токсикологічний аналіз.

ВСТУП. Агомелатин (N-[2-(7-метоксинафтален-1-іл)етил]ацетамід) – один із найефективніших лікарських засобів для терапії депресивних розладів. Агомелатин має інноваційний механізм дії, оскільки він є агоністом мелатонінергічних рецепторів MT₁ і MT₂ та антагоністом серотонінових 5-HT_{2C}-рецепторів, не впливає на захоплення моноамінів, не має спорідненості до альфа- і бета-адренергічних, гістамінергічних та бензодіазепінових рецепторів, не впливає на концентрацію внутрішньоклітинного серотоніну, підсилює вивільнення дофаміну і норадреналіну. За фармакологічною дією даний препарат не має аналогів [1, 2].

Крім безперечного терапевтичного ефекту, при прийманні великої дози агомелатину спостерігаються побічні та токсичні ефекти, які іноді стають причиною смертельних отруєнь [4, 5].

Тому з метою розробки оптимальних умов ізолювання агомелатину з біологічного матеріалу ми провели дослідження з вивчення впливу рН середовища і природи органічних розчинників на ступінь однократної екстракції агомелатину, а також розробили просту та експресну методику кількісного визначення досліджуваної сполуки, що ґрунтується на реакції агомелатину з *n*-диметиламінобензальдегідом.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. При вивченні умов екстракції готували розчин агомелатину в етанолі, в 1 мл якого містилось 100 мкг препарату (в перерахунку на основу). Для екстракції використовували такі свіжоперегнані органічні розчинники: хлороформ, 1,2-дихлоретан, гексан та суміш хлороформу з бутанолом (1:1).

© Н. М. Дармограй, 2012.

Для створення необхідного значення рН розчину застосовували універсальну буферну суміш. Значення рН буферних розчинів контролювали потенціометрично за допомогою рН-метра ОР-110 фірми "Radelkis" (Угорщина). Використовували буферні розчини зі значеннями рН від 2,5 до 11,0.

Екстракцію агомелатину проводили таким чином: у ділительні лійки вносили по 9,0 мл універсальної буферної суміші з відповідним значенням рН (від 2,5 до 11,0), по 1,0 мл етанольного розчину агомелатину (100 мкг/мл) і по 10,0 мл одного із вказаних вище органічних розчинників. Вміст ділительних лійок збовтували 2 хв і залишали на 5 хв для розділення фаз. Фазу органічних розчинників відділяли від водних фаз. Органічні розчинники випаровували в потоці азоту, а сухі залишки розчиняли в 5,0 мл метанолу.

Кількість агомелатину в досліджуваних пробах визначали спектрофотометрично за реакцією з *n*-диметиламінобензальдегідом. Для цього використовували по 1,0 мл метанольних розчинів. Методику кількісного визначення агомелатину в розчинах наведено нижче.

Залежність ступеня екстракції (R, %) агомелатину від рН середовища і природи органічних розчинників показано на рисунку 1.

У ході попередніх експериментальних досліджень було встановлено, що агомелатин утворює забарвлену сполуку з *n*-диметиламінобензальдегідом у середовищі концентрованої сульфатної кислоти. Інтенсивність забарвлення цієї сполуки стабільна протягом 60 хв.

Для побудови градуального графіка готували розчин агомелатину в метанолі (100 мкг/мл) та 10 % розчин *n*-диметиламіно-

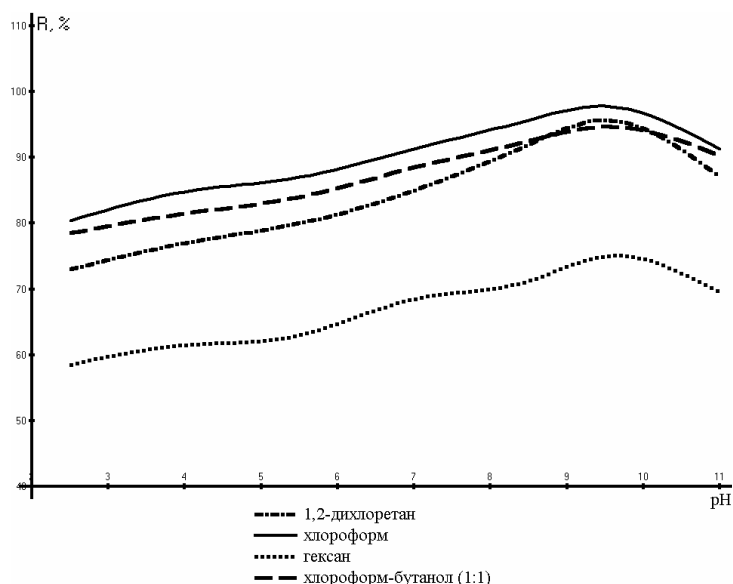


Рис. 1. Залежність ступеня екстракції агомелатину (R , %) від pH середовища та природи органічного розчинника.

бензальдегіду (ч.д.а.) в концентрованій сульфатній кислоті.

Побудова градувального графіка. В ряд градуйованих пробірок місткістю 10,0 мл вносили по 0,05, 0,1, 0,2, 0,5 та 0,7 мл стандартного розчину агомелатину в метанолі (100 мкг/мл) та по 0,4 мл 10 % розчину *n*-диметиламінобензальдегіду. Через 5 хв у кожну пробу вносили концентровану сульфатну кислоту до об'єму 5,0 мл. Паралельно готували розчин порівняння шляхом змішування 0,1 мл метанолу, 0,4 мл 10 % розчину *n*-диметиламінобензальдегіду і 4,5 мл концентрованої сульфатної кислоти.

Оптичну густину забарвлених розчинів вимірювали за допомогою спектрофотометра СФ-56 при довжині хвилі 505 нм ($l=1$ см) відносно розчину порівняння.

За одержаними даними будували градувальний графік (рис. 2) та розраховували рівняння прямої, користуючись методом найменших квадратів [3], яке має вигляд: $A=0,016C-0,008$, де A – оптична густина; C – концентрація агомелатину, мкг/мл. Встановлено, що оптична густина забарвлених розчинів підпорядковується основному закону світлопоглинання в межах концентрацій від 5 до 70 мкг у 5,0 мл кінцевого об'єму.

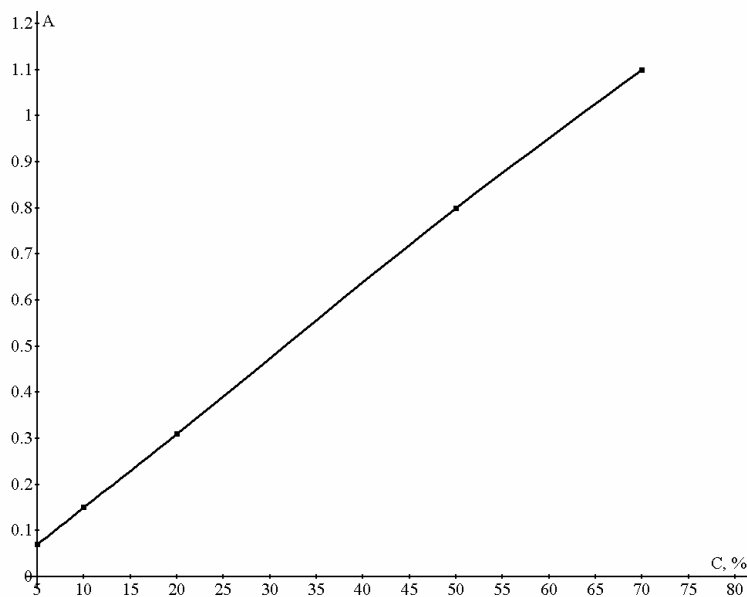


Рис. 2. Градувальний графік кількісного визначення агомелатину за реакцією з *n*-диметиламінобензальдегідом.

Достовірність результатів методики кількісного визначення агомелатину вивчали на метанольних розчинах препарату з концентрацією від 5 до 70 мкг в 1,0 мл розчину. Для цього в ряд градуйованих пробірок вносили по 1,0 мл розчину, в якому містилося від 5 до 70 мкг агомелатину, по 0,4 мл розчину *n*-диметиламінобензальдегіду і через 5 хв вносили концентровану сульфатну кислоту до об'єму 5,0 мл та вимірювали оптичну густину цих розчинів (спектрофотометр СФ-56, $\lambda=505$ нм, $l=1$ см).

Кількісний вміст препарату в пробі розраховували, використовуючи рівняння прямої. Результати кількісного визначення агомелатину в розчинах на основі реакції з *n*-диметиламінобензальдегідом наведено в таблиці.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Характер кривих екстракції свідчить про те, що агоме-

латин екстрагується хлороформом, гексаном, 1,2-дихлоретаном та сумішшю хлороформу з бутанолом (1:1) як із кислих, так і з лужних розчинів. Ділянка максимуму екстракції всіма розчинниками спостерігається в лужному середовищі.

Зокрема, хлороформом при рН 9,0–10,0 екстрагується до 97,8 % агомелатину. Сумішшю хлороформу з бутанолом (1:1) вдається виєкстрагувати до 94,7 % агомелатину при рН 8,5–9,5, а 1,2-дихлоретаном при рН 9,0–10,0 екстрагується до 95,7 % даної сполуки. Дещо менша кількість агомелатину екстрагується гексаном при рН 9,0–10,0 (до 75 %).

З даних, які наведено в таблиці, видно, що відносна похибка методики кількісного визначення агомелатину в розчинах складає $\pm 1,1$ %. Усі результати досліджень є надійними, оскільки вкладаються в межі довірчого інтервалу.

Таблиця – **Результати кількісного визначення агомелатину в розчинах (середнє з п'яти паралельних визначень)**

Взято агомелатину, мкг	Оптична густина	Знайдено агомелатину		Метрологічна характеристика
		мкг	%	
5	0,07	4,91	98,2	$\bar{X}=99,3$
10	0,15	9,9	99,0	$S=1,09$
20	0,31	19,9	99,5	$S_{\bar{x}}=4,8$
50	0,8	50,2	100,4	$\bar{X} \pm \Delta X = 99,3 \pm 1,09$
70	1,1	69,3	99,0	$\varepsilon = \pm 1,1 \%$

ВИСНОВКИ. 1. Вивчено залежність ступеня однократної екстракції агомелатину з водних розчинів від рН середовища та природи органічного розчинника. Встановлено, що найоптимальнішим розчинником є хлороформ, яким при рН 9,0–10,0 екстрагується до 97,8 % агомелатину.

2. Для кількісного визначення агомелатину в пробах запропоновано методику, яка ґрунтується на реакції з *n*-диметиламінобензаль-

дегідом у середовищі концентрованої сульфатної кислоти. Оптична густина забарвлених розчинів підпорядковується основному закону світлопоглинання в межах концентрацій від 5 до 70 мкг агомелатину в пробі. Межа кількісного визначення становить 5 мкг агомелатину в 5,0 мл кінцевого об'єму. Відносна похибка кількісного визначення агомелатину в розчинах становить $\pm 1,1$ %.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Амон М. Перспективы в изучении патогенеза и терапии аффективных расстройств: роль мелатонина и серотонина / М. Амон, П.-А. Буае, Е. Моке // Журн. неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. – 2007. – № 11. – С. 77–84.
2. Волель Б. А. Вальдоксан (агомелатин): инновационный механизм действия / Б. А. Волель // Психиатрия и психофармакотерапия. – 2008. – **10**, № 3. – С. 35–39.
3. Чарыков А. К. Математическая обработка ре-

зультатов химического анализа / А. К. Чарыков. – Л.: Химия, 1984. – С. 168.

4. Anxiolytic properties of agomelatine, an antidepressant with melatonergic and serotonergic properties: role of 5-HT_{2C} receptor blockade / M. J. Millan, M. Brocco, A. Gobert [et al.] // Psychopharmacology. – 2007. – **177**, № 5. – P. 448–458.

5. Fornaro M. Agomelatine in the treatment of panic disorder / M. Fornaro // Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. – 2011. – **35**. – P. 286–287.

ИЗУЧЕНИЕ УСЛОВИЙ ЭКСТРАКЦИИ АГОМЕЛАТИНА ОРГАНИЧЕСКИМИ РАСТВОРИТЕЛЯМИ

Резюме

Изучена эффективность экстракции агомелатина хлороформом, 1,2-дихлорэтаном, гексаном и смесью растворителей хлороформ-бутанол (1:1) из водных растворов при различных значениях pH среды. Предложена методика количественного определения агомелатина на основе реакции с *p*-диметиламинобензальдегидом в среде концентрированной сульфатной кислоты. Результаты исследований могут быть использованы при химико-токсикологическом анализе агомелатина.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: агомелатин, экстракция, количественное определение, химико-токсикологический анализ.

N. M. Darmohrai
DANYLO HALYTSKYI LVIV NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY

INVESTIGATION CONDITIONS OF EXTRACTION OF AGOMELATINE BY ORGANIC SOLVENTS

Summary

The efficiency of agomelatine extraction by chloroform, 1,2-dichloroethane, hexane and a mixture of solvents chloroform-butanol (1:1) from aqueous solutions at different meanings of medium pH was investigated. The method of quantitative determination of agomelatine was proposed. This method is based by reaction with *p*-dimethylaminobenzaldehyde in an environment of concentrated sulfate acid. The research results can be used in chemical and toxicological analysis of agomelatine.

KEY WORDS: agomelatine, extraction, quantitative determination, chemical and toxicological analysis.

Отримано 06.03.12

Адреса для листування: Н. М. Дармограй, вул. Некрасова, 47/32, Львів, 79014, Україна, e-mail: snowfun@mail.ru

А. М. Рубан¹, А. І. Казанець¹, Т. В. Крупська², В. В. Туров²
 КЛІНІЧНА ОФТАЛЬМОЛОГІЧНА ЛІКАРНЯ "ЦЕНТР МІКРОХІРУРГІЇ ОКА"¹, КИЇВ
 ІНСТИТУТ ХІМІЇ ПОВЕРХНІ ІМЕНІ О. О. ЧУЙКА НАН УКРАЇНИ², КИЇВ

МІЖФАЗНІ ВЗАЄМОДІЇ ВІТРЕОРЕТИНАЛЬНОГО СИЛІКОНУ З РОЗЧИНОМ ГІАЛУРОНОВОЇ КИСЛОТИ

Методом ¹H ЯМР-спектроскопії з пошаровим виморожуванням рідкої фази досліджено властивості силікону та диспергованого в ньому розчину гіалуронової кислоти. Встановлено, що, крім сигналу метильних груп силікону ($\delta_H=0$ м.ч.), в спектрах присутній слабоінтенсивний сигнал води ($\delta_H=5,5$ м.ч.), зв'язаної з полімерними молекулами. Ведення в середовище полімеру 1,5 % розчину гіалуронової кислоти полегшує процес кристалізації емульсії та погіршує її оптичну однорідність.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: ¹H ЯМР-спектроскопія, силікон, гіалуронова кислота, кластери води.

ВСТУП. В останні роки силіконова ендотампонада отримала широке застосування в офтальмохірургії для лікування ряду патологій, пов'язаних з розвитком ускладнень відшарування сітківки (діабетична проліферативна ретинопатія, травма ока, регматогенне відшарування сітківки) [10]. Незважаючи на високу ефективність вітреоретинальних втручань, розвиток емульсифікації силікону може призвести до цілого ряду серйозних ускладнень (вторинна глаукома, запалення, репроліферація епіретинальних мембран), здатних погіршити анатомічний і функціональний результати операцій та вимагають повторного хірургічного втручання [5, 9].

Значну частину силіконових масел для вітреоретинальної хірургії виготовляють на основі полідиметилсилоксанів з різною молекулярною масою. Вони можуть містити добавки гетерополімерів і фторполімерів, які впливають на густину силіконів та їх механічні характеристики (в'язкість, пружність та ін.) [4]. Силікони – гідрофобні речовини, які практично не змішуються з водою чи водними розчинами низькомолекулярних органічних сполук. Оскільки основною полімерною складовою склоподібного тіла є гіалуронова кислота (ГК), яка виробляється в преретинальних шарах кортикального гелю склоподібного тіла [6], в процесі ендотампонади силіконового масла здійснюється контакт гідрофобної поверхні силікону з розчином гіалуронової кислоти. Незважаючи на високу гідратованість ГК, її молекули можуть взаємодіяти з полімерними ланцюгами силіконів з утворенням вандер-

ваальсових комплексів, в яких молекули води витісняються із зазору між полімерними ланцюгами силікону і ГК. Крім того, можна очікувати, що розчини гіалуронової кислоти за певних умов можуть формувати емульсійні включення в силіконі, які впливають на його оптичні та механічні характеристики.

Метою даної роботи було вивчити методом низькотемпературної ¹H ЯМР-спектроскопії властивості силікону (Oxane 5700, Bausch+Lomb), який використовували тривалий час як імплантат.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. *Матеріали.* Силікон (Oxane 5700, Bausch+Lomb) було аспіровано з ока пацієнта через 6 місяців після проведеної раніше вітреоретинальної операції до скляного шприца.

Для дослідження використовували ліофілізовану ГК, яку розчиняли в дистильованій воді при кімнатній температурі.

¹H ЯМР-спектроскопія. Спектри ЯМР одержували на ЯМР-спектрометрі високого розрішення (Varian "Mercury") з робочою частотою 400 МГц. Використовували 90° зонду-ючий імпульс тривалістю 3 мкс. Температура в датчику регулювалась термоприставкою Bruker VT-1000 з точністю ± 1 град. Інтенсивності сигналів визначали шляхом вимірювання площі піків з використанням (при необхідності) процедури розкладу сигналу на його складові в припущенні гауссівської форми сигналу та оптимізації його нульової лінії і фази з точністю, яка для добре розділених сигналів була не меншою 5 %, а для сигналів, які перекриваються, – ± 10 %. Для запобігання переохолодженню рідини в досліджуваних об'єктах

вимірювання концентрації незамерзаючої води проводили при нагріванні зразків, попередньо охолоджених до температури 210 К. Методику ЯМР-вимірювань та визначення радіуса кластерів міжфазної води детально описано в роботах [1, 2, 8].

Для визначення геометричних розмірів кластерів адсорбованої води використовували рівняння Гіббса–Томпсона, яке зв'язує радіус сферичного чи циліндричного водного кластера (R) з величиною депресії температури замерзання:

$$\Delta T_m = T_m(R) - T_{m,\infty} = \frac{2\sigma_{sl} T_{m,\infty}}{\Delta H_f \rho R}, \quad (1)$$

де $T_m(R)$ – температура плавлення льоду, локалізованого в порах радіуса R ; $T_{m,\infty}$ – температура плавлення об'ємного льоду; ρ – густина твердої фази; σ_{sl} – енергія взаємодії твердого тіла з рідиною; ΔH_f – об'ємна ентальпія плавлення. Це рівняння можна використовувати для обчислення розподілу пор за розмірами з температурної залежності концентрації незамерзаючої води (C_{uw}), одержаної на основі методу ^1H ЯМР-спектроскопії з пошаровим виморожуванням води, для водних суспензій твердих тіл чи гідратованих біологічних об'єктів, коли застосування інших методів аналізу структурних характеристик утруднене [2]. Для практичного використання рівняння (1) можна застосовувати у вигляді $\Delta T_m = (k/R)$, де константа k для багатьох гетерогенних систем, які містять воду, близька до 50 К нм [7].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. На рисунку 1, а наведено зняті при різній температурі спектри ^1H ЯМР силікону (5700 cSt) після його тривалого (6 місяців) контакту з внутрішньочинними тканинами. Сигнал протонів силікону спостерігається у вигляді одиночного сигналу з хімічним зсувом протонів $\delta_H=0$ м.ч. Така величина хімічного зсуву характерна для метильних груп у кремнієорганічних сполуках. Зі зниженням температури інтенсивність сигналу зменшується, що свідчить про часткове замерзання силікону. Для сильногідрофобних полімерів при зниженні температури характерним є формування молекулярних кристалів, в яких окремі полімерні молекули зв'язані одна з одною вандерваальсовими взаємодіями. Зменшення інтенсивності сигналу метильних груп вказує на значне зниження їх рухливості (коливальної та обертальної) [3] при формуванні молекулярного кристалу силікону.

Крім сигналу метильних груп силікону, в спектрах фіксується слабоінтенсивний сигнал протонів у межах $\delta_H=5,5$ м.ч. Зі зниженням

температури його інтенсивність швидко зменшується і при $T<270$ К перестає реєструватися в спектрах. Спектральні характеристики даного сигналу відповідають параметрам води, зв'язаної полімерними молекулами [1].

Для підтвердження можливості проникнення в середовище силікону розчину ГК у нього ввели певну кількість 1,5 % розчину ГК, після чого зразок піддавали обробці ультразвуком (4 хв, 293 К) в ультразвуковому диспергаторі УЗДН-1. В результаті до 5 мас% розчину гіалуронової кислоти (відносно маси силікону) було суспендовано в силікон. При цьому оптична однорідність силікону істотно погіршувалась. Він набував матового відтінку, який зберігався протягом тривалого часу, що дозволяє зробити висновок про можливість формування в силіконі стабільної суспензії розчину ГК. Спектри емульсії ГК у силіконі наведено на рисунку 1, б, в. У спектрах в широкому діапазоні зміни температури добре спостерігалися сигнали метильних груп силікону (рис. 1, б) та води, зв'язаної з молекулами ГК (рис. 1, в). Спектральні параметри води в емульсії силікону близькі до тих, що характерні для вихідного силікону (порівнюючи рис. 1, а та 1, б). Порівняння інтенсивностей сигналу метильних груп силікону і води (до початку процесу кристалізації) дозволяє оцінити концентрацію емульсії, яка виявилась близькою до 5 % (відносно маси силікону).

За температурною залежністю концентрації незамерзаючої води ($C_{uw}(T)$) в процесі її розморожування (рис. 2, а) при використанні рівняння (1) розраховано розподіл за радіусами кластерів води, зв'язаних з молекулами ГК (рис. 2, б).

На залежностях $C_{uw}(T)$ реєструються дві ділянки, одна з яких (при $T>265$ К) відповідає швидкій зміні концентрації незамерзаючої води у вузькому діапазоні зміни температури. Вільна енергія даного типу води незначно знижена адсорбційними взаємодіями з молекулами ГК. Відповідно до класифікації, наведеної в [1, 2, 8], така вода є слабозв'язаною (WBW). Друга ділянка залежності $C_{uw}(T)$ (при $T\leq 265$ К) відповідає ознакам сильнозв'язаної води (SBW). На основі даних рисунка 2, а можна зазначити, що $C_{SBW}=4$ мг/г, а $C_{WBW}=46$ мг/г.

Слабоасоційована вода входить до складу кластерів, радіус яких складає 6–16 нм (рис. 2, б). Для сильнозв'язаної води радіус кластерів становить 0,4–5 нм (рис. 2, б).

На рисунку 3 наведено залежності зміни температурної інтенсивності сигналу метильних груп силікону вихідного і того, який містить емульсію ГК.

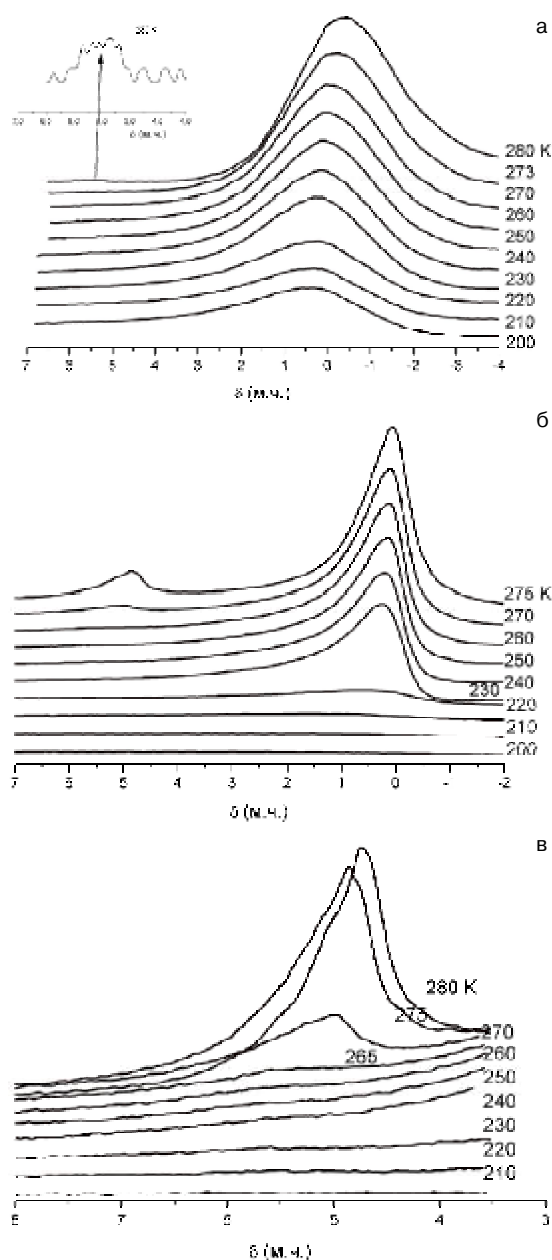


Рис. 1. Зняті при різній температурі спектри ^1H ЯМР силікону, який використовували як очний імплантат, до (а) та після УЗ-суспендування, де 1,5 % розчин гіалуронової кислоти (б, в).

Як уже зазначалось вище, зменшення інтенсивності сигналу пов'язане з формуванням при низькій температурі молекулярних кристалів силікону. З даних рисунка 3 випливає, що диспергування в силіконі розчину ГК істотно полегшувало процес кристалізації. При однаковій швидкості нагрівання зразків, за присутності ГК вона здійснювалась при вищій температурі. Таким чином, формування у фазу силікону нанокрапель розчину ГК може істотно позначатися на фізико-хімічних властивостях силікону, що повинно відображатися і на його механічних властивостях.

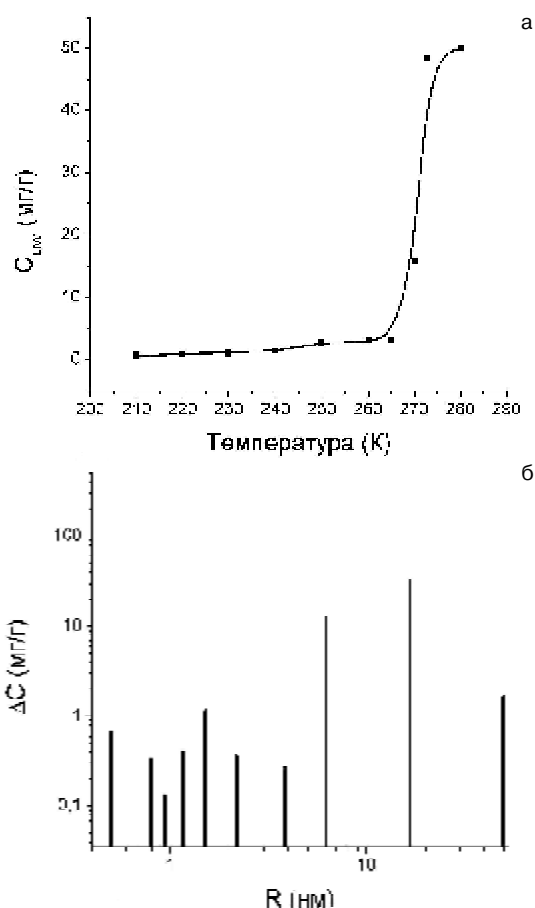


Рис. 2. Температурна залежність концентрації незамерзаючої води в емульсії 1,5 % розчину ГК у силіконі (а) та побудований на її основі розподіл за радіусами кластерів адсорбованої води (б).

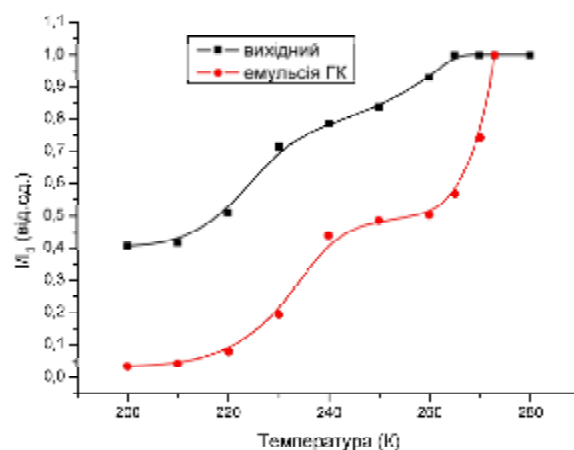


Рис. 3. Відносні зміни з температурою сигналу метильних груп вихідного силікону та силікону з диспергованим у ньому 1,5 % розчином ГК.

ВИСНОВКИ. 1. Встановлено можливість формування колоїдних розчинів гіалуронової кислоти в силіконовому маслі. При цьому разом із молекулами ГК у середовище силікону переноситься певна кількість води, яка перебуває у вигляді кластерів, що зв'язані з молекулами ГК та мають радіус 0,4–16 нм.

2. Присутність у силіконовому маслі нано-крапель розчину ГК істотно впливає на процес

кристалізації рідкого силікону, що може позначатися на його фізико-хімічних та оптичних характеристиках.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гунько В. М. Вода на межфазній границі / В. М. Гунько, В. В. Туров, П. П. Горбик. – К. : Наукова думка, 2009. – 694 с.
2. Туров В. В. Кластеризованная вода и пути ее использования / В. В. Туров, В. М. Гунько. – К. : Наукова думка, 2011. – 313 с.
3. Emsley J. W. High resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy / J. W. Emsley, J. Feeney, L. H. Sutcliffe. – Oxford : Pergamon Press, 1965. – 1154 p.
4. Hardingham T. E. Proteoglycans: many forms and functions / T. E. Hardingham, A. J. Fosang // The FASEB J. – 1992. – **6**. – P. 861–870.
5. Histopathological findings in eyes after silicone oil injection / B. Kirchhof, U. Tavakolian, H. Paulmann, K. Heimann // Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. – 1986. – **224**, № 1. – P. 34–37.

6. Osterlin S. The synthesis of hyaluronic acid in vitreous. I. Soluble and particulate transferases in hyalocytes / S. Osterlin, B. Jacobson // Experimental eye research. – 1968. – **7**, № 4. – P. 497–510.
7. Petrov O. V. NMR cryoporometry: Principles, application and potential / O. V. Petrov, I. Furo // Progr. In NMR. – 2009. – **54**. – P. 97–122.
8. Unusual properties of water at hydrophilic/hydrophobic Interfaces / V. M. Gun'ko, V. V. Turov, V. M. Bogatyrev [et al.] // Adv. Colloid. Interf. Sci. – 2005. – **118**, № 1–3. – P. 125 – 172.
9. Valone J. Jr. Emulsified anterior chamber silicone oil and glaucoma / J. Jr. Valone, M. McCarthy // Ophthalmology. – 1994. – **101**, № 12. – P. 1908–1912.
10. Vitrectomy with silicone oil infusion in severe diabetic retinopathy / A. Castellarin, R. Grigorian, N. Bhagat [et al.] // Br. J. Ophthalmol. – 2003. – **87**. – P. 318–321.

А. Н. Рубан¹, А. И. Казанец¹, Т. В. Крупская², В. В. Туров²

*КЛИНИЧЕСКАЯ ОФТАЛЬМОЛОГИЧЕСКАЯ БОЛЬНИЦА “ЦЕНТР МИКРОХИРУРГИИ ГЛАЗА”¹, КИЕВ
ИНСТИТУТ ХИМИИ ПОВЕРХНОСТИ ИМЕНИ А. А. ЧУЙКО НАН УКРАИНЫ², КИЕВ*

МЕЖФАЗНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ВИТРЕОРЕТИНАЛЬНОГО СИЛИКОНА С РАСТВОРОМ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ

Резюме

Методом ¹H ЯМР-спектроскопии с послойным вымораживанием жидкой фазы исследовано свойства силикона и диспергированного в нем раствора гиалуроновой кислоты. Установлено, что, кроме сигнала метильных групп силикона ($\delta_H=0$ м.д.), в спектрах присутствует слабоинтенсивный сигнал воды ($\delta_H=5,5$ м.д.), связанной с полимерными молекулами. Введение в среду полимера 1,5 % раствора гиалуроновой кислоты облегчает процесс кристаллизации эмульсии и ухудшает ее оптическую однородность.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ¹H ЯМР-спектроскопия, силикон, гиалуроновая кислота, кластеры воды.

A. M. Ruban¹, A. I. Kazanets¹, T. V. Krupskaya², V. V. Turov²

*CLINICAL EYE HOSPITAL “EYE MICROSURGERY CENTER”¹, KYIV
O. O. CHUIKO INSTITUTE OF SURFACE CHEMISTRY OF NAS OF UKRAINE², KYIV*

INTERPHASE INTERACTION OF VITREORETINALIC SILICONE WITH A SOLUTION OF HYALURONIC ACID

Summary

The properties of silicone and dispersion in silicone of hyaluronic acid (HA) solution was study by ¹H NMR spectroscopy method with layer by layer freezing out of liquid phase. Its shown that beside the signal of methyl groups of silicone ($\delta_H=0$ ppm.) in the spectra presents less intensive signal of water ($\delta_H=5,5$ ppm), bonded with HA molecules. With the introduction insilicone medium of 1,5 % HA solution the process of crystallization of the silicone is worsened and its optical homogeneity is deteriorated.

KEY WORDS: ¹H NMR-spectroscopy, silicone, hyaluronic acid, water clusters.

Отримано 22.05.12

Адреса для листування: Т. В. Крупська, вул. Генерала Наумова, 17, Київ-164, 03164, Україна.

Г. В. Максимюк¹, З. Д. Воробець¹, В. М. Максим'юк²
 ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ДАНИЛА ГАЛИЦЬКОГО¹
 ІНСТИТУТ СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА КАРПАТСЬКОГО РЕГІОНУ², ЛЬВІВ–ОБРОШИНО

ГОМЕОСТАЗ ІОНІВ СОЛЕЙ ЛУЖНИХ МЕТАЛІВ НАТИВНОЇ СПЕРМИ

Експериментально виявили три групи бугаїв, які постійно виділяють еякуляти з індивідуально низькою, середньою або високою концентрацією K^+ . Визначені різні рівні концентрації іонів дозволяють висунути припущення про генетичний контроль організму самця (плідника) за концентрацією K^+ у спермі та її зв'язок із запліднювальною здатністю сперматозоїдів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: еякулят, кальцій, калій, натрій, запліднювальна здатність сперматозоїдів.

ВСТУП. Вивчення особливостей концентрації і співвідношень (гомеостазу) іонів органічних та неорганічних сполук сперми розпочато ще у XVIII столітті [6]. В загальних рисах учені акцентували увагу на визначенні параметрів вказаних показників та їх зв'язку з показниками якості сперматозоїдів нативної, розрідженої, еквіліброваної сперми і деконсервованих спермодоз [1–5, 12]. Однак опубліковані вченими повідомлення не в повну міру систематизовані, часткові й фрагментарні, а в окремих випадках – навіть суперечливі [7, 9, 10, 14–16]. Тому, з огляду на це, за визначеннями у спермі бугаїв лімітами (min...max) концентрації Ca^{2+} , K^+ , Na^+ спермальної плазми і сперматозоїдів вивчали особливості розподілу і співвідношень їх одно- ($Ca^{2+}:Ca^{2+}$, $K^+:K^+$, $Na^+:Na^+$) та різнойменних ($Na^+:K^+$, $K^+:Ca^{2+}$, $Na^+:Ca^{2+}$) пар у системі “клітина–середовище” (спермальна плазма, сперматозоїди та між ними).

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліджували сперму 68 фізіологічно здорових чорно-рябих бугаїв місцевої, британофризької, німецької і голштинської порід, червоно-рябої голштинської породи, червоної датської, абердин-ангуської, симентальської і лімузинської порід віком 2–9 років. Отримали й оцінили 690 еякулятів. Межа (lim) концентрації сперматозоїдів в еякулятах становила 0,06–2,25 млрд/см³ сперми. Наведені показники визначали за приписами методик [11]. Результати досліджень аналізували методом варіаційної статистики [8] з використанням пакета програм “Microsoft Excel” персонального комп'ютера © Г. В. Максимюк, З. Д. Воробець, В. М. Максим'юк, 2012.

типу Pentium. Дані проведеного експерименту аналізували за розрахованими показниками середнього арифметичного (M), стандартної похибки (m), коефіцієнта варіації (C_v) і вірогідності різниці (p).

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Аналіз результатів досліджень показав, що окремо взяті бугаї різних порід, різного віку в різні сезони року виділяли еякуляти з постійно однаковою концентрацією K^+ . Впродовж п'яти років у 151 еякуляті 13 бугаїв постійно визначали параметри низької (16–33 мМ), у 451 еякуляті 40 бугаїв – середньої (25–46 мМ), а у 88 еякулятах 15 бугаїв – високої (32–69 мМ) концентрації K^+ . Це означає, що відсоток бугаїв дослідної вибірки, секреторні тканини системи органів відтворення яких виділяють сперму з низькою концентрацією K^+ , становив 19, із середньою – 59, а з високою – 22 % (рис.).

Важливою ознакою виявленого феномена є те, що високі значення коефіцієнта варіації концентрації сперматозоїдів в еякулятах бугаїв усіх трьох дослідних груп ($C_v=54–63$ %) супроводжували його низькі значення для показників концентрації Ca^{2+} , які визначили у спермальній плазмі й сперматозоїдах еяку-

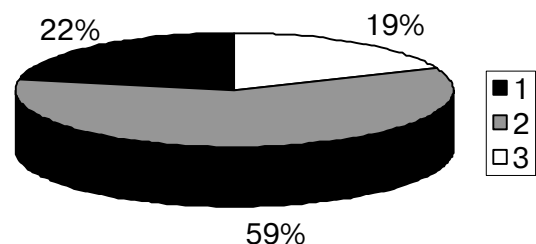


Рис. Кількість бугаїв дослідної вибірки (%) у групах з низькою (1), середньою (2) і високою (3) концентрацією калію.

лятів першої та другої груп ($C_v=13-23\%$). Однак в еякулятах третьої групи значення вказаного показника зростало до 36% . Ліміти відхилень від середніх значень показника суми концентрацій Ca^{2+} у спермі ($8,0-9,3\text{ мМ}$) та її розподілу між спермальною плазмою ($6,3-7,5\text{ мМ}$) і сперматозоїдами ($1,7-1,8\text{ мМ}$) незначні (табл. 1).

За високої нестабільності показників концентрації сперматозоїдів в еякулятах бугаїв усіх трьох груп ($p>0,5$ і $0,2$) тенденція до вірогідних змін ($p<0,1$, $0,02$, $0,05$) була властива лише показникам суми концентрацій Ca^{2+} у спермі та показникам відокремленої від сперматозоїдів спермальної плазми першої і другої та другої і третьої груп еякулятів.

Результати аналізу отриманих для спермальної плазми та сперматозоїдів показників концентрації K^+ і Na^+ свідчать про те, що високі, середні значення концентрації Na^+ спермальної плазми (81 і 70 мМ) та сперматозоїдів (21 і 18 мМ) еякулятів бугаїв першої і другої дослідних груп супроводжували, відповідно, низькі (16 і 27 та 6 і 11 мМ) показники концентрації K^+ . Якщо концентрації K^+ і Na^+ спермальної плазми та сперматозоїдів еякулятів першої і другої груп властива обернена залежність (висока Na^+ – низька K^+ або висока K^+ – низька Na^+), то у спермальній плазмі й сперматозоїдах еякулятів третьої групи концентрації K^+ (47 і 15 мМ) та Na^+ (56 і 14 мМ) майже однакові. При цьому вірогідність різниці показників

спермальної плазми, сперматозоїдів та їх суми між групами дуже висока ($p\leq 0,001$).

Цікавим слід вважати те, що показники співвідношень концентрацій різнойменних пар іонів спермальної плазми, сперматозоїдів та їх суми в еякулятах бугаїв кожної групи майже однакові. Різниця між ними становить лише $\pm 1-2$ частини вмісту (табл. 2).

Доцільно наголосити і на тому, що найвищі ($11-12:1$) значення числового виразу співвідношень $Na^+:Ca^{2+}$ властиві спермальній плазмі та сперматозоїдам еякулятів бугаїв першої і другої дослідних груп. Вказаний показник в еякулятах бугаїв третьої групи на 3 частини вмісту Na^+ однаково менший ($8:1$). Показовим також є те, що еякулятам усіх груп бугаїв притаманна стабільність показників, які характеризують співвідношення концентрацій $Na^+:K^+$, але їх величина в еякулятах бугаїв першої групи на $4-5$ частин вмісту Na^+ більша ($4-5:1$), ніж у третій ($1:1$). Це означає, що концентрації K^+ і Na^+ в еякулятах бугаїв третьої групи збігаються.

Аналогічно, але в $3-5$ разів вищу перемену значень показника співвідношень концентрацій вказаних пар іонів визначили між спермальною плазмою і сперматозоїдами. Якщо зменшення значень числового виразу співвідношень концентрацій $Na^+:K^+$ ($14:1$, $6:1$, $4:1$) та $Na^+:Ca^{2+}$ ($45:1$, $41:1$, $32:1$) було спрямоване від першої групи еякулятів до третьої, то $K^+:Ca^{2+}$ ($26:1$, $16:1$, $9:1$) – від третьої до першої. Однак

Таблиця 1 – Концентрація іонів у спермі, мМ

Група бугаїв	Кількість еякулятів (n)	Стат. показники	Концентрація сперматозоїдів, млрд/см ³	Ca ²⁺			K ⁺			Na ⁺		
				Спермальна плазма	Сперматозоїди	Σ	Спермальна плазма	Сперматозоїди	Σ	Спермальна Плазма	Сперматозоїди	Σ
Перша	151	M	1,04	7,52	1,82	9,34	15,56	5,80	21,36	81,48	21,21	102,69
		$\pm m$	0,14	0,27	0,07	0,28	0,68	0,48	1,02	2,39	0,89	1,92
		lim	0,1–2,2	4,8–9,5	1,0–2,2	6,7–12	12–23	2–10	16–34	68–107	11–27	93–123
		C_v	60,75	16,15	17,29	13,36	19,61	37,23	21,34	13,12	18,75	8,34
		$p_{1:2}$	$>0,5$	$<0,02$	$>0,2$	$<0,02$	$<0,001$	$<0,001$	$<0,001$	$<0,001$	$<0,001$	$<0,001$
Друга	451	M	1,00	6,27	1,70	7,97	26,98	10,82	37,80	69,87	18,00	87,87
		$\pm m$	0,15	0,32	0,07	0,37	0,73	0,58	1,14	1,98	0,44	2,00
		lim	0,1–2,3	2,1–8,6	0,7–2,0	2,1–11	21–31	3–15	25–46	47–82	13–21	64–98
		C_v	63,46	22,38	16,99	20,47	11,81	23,23	13,14	12,37	10,64	9,94
		$p_{2:3}$	$>0,5$	$<0,05$	$>0,5$	$<0,1$	$<0,001$	$<0,001$	$<0,001$	$<0,001$	$<0,001$	$<0,001$
Третя	88	M	0,82	7,26	1,76	9,02	46,64	14,79	61,43	55,91	14,38	70,29
		$\pm m$	0,12	0,40	0,17	0,55	1,83	0,76	2,44	2,08	0,63	2,28
		lim	0,2–1,7	3,3–9,1	0,6–2,5	3,9–12	26–54	6–19	32–69	48–69	12–18	62–87
		C_v	54,46	20,68	36,20	22,94	14,70	19,14	14,84	13,89	16,51	12,14
		$p_{1:3}$	$>0,2$	$>0,5$	$>0,5$	$>0,5$	$<0,001$	$<0,001$	$<0,001$	$<0,001$	$<0,001$	$<0,001$

Таблиця 2 – Співвідношення концентрацій іонів у спермі, ч. в.*

Група бугаїв	Об'єкт	Пари					
		різнойменні			однойменні		
		Na ⁺ :K ⁺	K ⁺ :Ca ²⁺	Na ⁺ :Ca ²⁺	Ca ²⁺ :Ca ²⁺	K ⁺ :K ⁺	Na ⁺ :Na ⁺
Перша	Спермальна плазма	5:1	2:1	11:1	–	–	–
	Сперматозоїди	4:1	3:1	12:1	–	–	–
	Сперма, Σ	5:1	2:1	11:1	–	–	–
	Спермальна плазма: сперматозоїди	14:1	9:1	45:1	4:1	3:1	4:1
Друга	Спермальна плазма	3:1	4:1	11:1	–	–	–
	Сперматозоїди	2:1	6:1	11:1	–	–	–
	Сперма, Σ	2:1	5:1	11:1	–	–	–
	Спермальна плазма: сперматозоїди	6:1	16:1	41:1	4:1	2:1	4:1
Третя	Спермальна плазма	1:1	6:1	8:1	–	–	–
	Сперматозоїди	1:1	8:1	8:1	–	–	–
	Сперма, Σ	1:1	7:1	8:1	–	–	–
	Спермальна плазма: сперматозоїди	4:1	26:1	32:1	4:1	3:1	4:1

Примітка. ч. в. * – числовий вираз, який характеризує співвідношення високої концентрації іонів до низької між одно- та різнойменними парами.

величина співвідношень Na⁺:K⁺, K⁺:Ca²⁺, Na⁺:Ca²⁺ в еякулятах першої групи становила, відповідно, 14:1, 9:1, 45:1, другої – 6:1, 16:1, 41:1, третьої – 4:1, 26:1, 32:1. Важливим, з нашої точки зору, є те, що значення співвідношень однойменних пар іонів між спермальною плазмою і сперматозоїдами в еякулятах бугаїв усіх трьох груп однаково високе для Ca²⁺:Ca²⁺ і Na⁺:Na⁺ (4:1), але на 1–2 частини вмісту менше для K⁺:K⁺ (2–3:1).

ВИСНОВОК. Результати аналізу визначених параметрів концентрацій і співвідношень Ca²⁺, K⁺, Na⁺ свідчать про виявлену нами індивідуальну особливість бугаїв виділяти еякуляти з постійно низькою, середньою або високою концентрацією K⁺. Сформульований

висновок підтверджують дослідження, результати яких вказують на те, що наявність стабільно однакових показників концентрації іонів у спермі контролюється генетичними чинниками і передається плідникам у спадок [2, 3, 13–15]. Це дозволяє висунути на обговорення та експериментальне підтвердження (заперечення) гіпотезу про те, що генетичний контроль організму самця (плідника) за концентраціями (гомеостазом) вільних і зв'язаних з неорганічними та органічними сполуками іонів солей макро- і мікроелементів зумовлює наявність постійно однакових, індивідуально низьких, середніх або високих рівнів концентрації K⁺ у спермі людини, свійських і диких тварин та їх зв'язок із запліднювальною здатністю сперматозоїдів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Варнавский А. Н. Микро- и макроэлементы спермы, их роль в воспроизводстве с.-х. животных / А. Н. Варнавский, С. Абсаматов. – Москва, 1991. – С. 28–42.
2. Канцедаль В. И. Уровень концентрации натрия в сперме быков и ее оплодотворяющая способность / В. И. Канцедаль // Науч. техн. бюллетень НИИЖ Лесостепи и Полесья УССР. – 1982. – № 34. – С. 37–39.
3. Кононов В. П. Трансмембранные перемещения ионов калия, натрия и кальция в сперматозоидах быков как показатели их биологической полноценности / В. П. Кононов, М. Мамбеталиев, В. Турбин // С.-х. биология. – 1993. – № 4. – С. 47–52.
4. Максим'юк В. М. Іони макроелементів у спермі бугаїв // Науковий вісник національного аграрного університету / В. М. Максим'юк // Проблеми

фізіології і патології відтворення тварин. – К., 2000. – № 22. – С. 156–161.

5. Максим'юк В. М. Кальцій, натрій, калій сперми бугаїв: вміст, розподіл, співвідношення / В. М. Максим'юк, Г. В. Зверева // Вісник аграрної науки. – 1997. – № 2. – С. 23–24.

6. Мишер Ф. Труды по биохимии / Ф. Мишер. – М., 1985. – С. 145–175.

7. Несмеянова Т. Н. Содержание электролитов в сперме с.-х. животных / Т. Н. Несмеянова // Доклады ВАСХНИЛ. – 1940. – № 40. – С. 28.

8. Плохинский Н. А. Биометрия / Н. А. Плохинский. – М., 1970. – 367 с.

9. Профиров Я. Ролята на плазмената мембрана в распределението на калий, натрий и кальций в спермата от коч при дълбоко замразяване / Я. Про-

фиров, Н. Иванов, П. Попова // Вет. мед. науки. – 1986. – № 3. – С. 73–77.

10. Семаков В. Проницаемость цитоплазматических мембран сперматозоидов быка и хряка для натрия, калия, кальция и фосфора под влиянием низких температур / В. Семаков, Т. Рыжков // С.-х. биология. – 1976. – **11**, № 2. – С. 200–204.

11. Технологія одержання сперми і способи оцінки життєздатності сперматозоїдів / [В. П. Буркат, О. Є. Гузеватий, Г. М. Седіло та ін.]. – Оброшино, 2006. – 42 с.

12. Aitken R. J. Sperm function test and fertility / R. J. Aitken // Int. Journal of Andrology. – 2006. – **29**. – P. 69–75.

13. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility / D. Ren, B. Navarro, G. Perez [et al.] // Nature. – 2001. – **413** (6856). – P. 603–609.

14. Barfield J. P. Characterization of potassium channels involved in volume regulation of human spermatozoa / J. P. Barfield, C. H. Yeung, T. G. Cooper // Molecular Human Reproduction. – 2005. – **11**. – P. 891–897.

15. Determinants of sperm quality and fertility in domestic species / A. M. Petrunkina, D. Waberski, A. R. Gunzel-Apel, E. Topfer-Petersen // Reproduction. – 2007. – **134**. – P. 3–17.

16. Ion Transport in Sperm Signaling / A. Darszon, C. Beltran, R. Felix, T. Nishigaki // Developmental Biology. – 2001. – **240**, Is. 1. – P. 1–14.

А. В. Максимюк¹, З. Д. Воробец¹, В. М. Максимьюк²

*ЛЬВОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ДАНИЛА ГАЛИЦКОГО¹
ИНСТИТУТ СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА КАРПАТСКОГО РЕГИОНА², ЛЬВОВ-ОБРОШИНО*

ГОМЕОСТАЗ ИОНОВ СОЛЕЙ ЩЕЛОЧНЫХ МЕТАЛЛОВ НАТИВНОЙ СПЕРМЫ

Резюме

Экспериментально обнаружили три группы быков, которые постоянно выделяют эякуляты с индивидуально низкой, средней или высокой концентрацией K^+ . Установленные различные уровни концентрации ионов позволяют выдвинуть предположение о генетическом контроле организма самца (производителя) по концентрации K^+ в сперме и ее связи с оплодотворяющей способностью сперматозоидов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эякулят, кальций, калий, натрий, оплодотворяющая способность сперматозоидов.

H. V. Maksymiuk¹, Z. D. Vorobets¹, V. M. Maksymyuk²

*DANYLO HALYTSKYI LVIV NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY¹
INSTITUTE OF AGRICULTURE OF CARPATHIAN REGION², LVIV-OBROSHYNO*

HOMEOSTASIS OF IONS OF THE ALKALI METAL SALTS IN THE NATIVE SPERM

Summary

We have experimentally identified three groups of bulls, which constantly produce ejaculates with individually low, medium, or high concentration of K^+ . The determined variety of values of ion concentration lead to the assumption that male organism genetically controls K^+ concentration in the sperm and has influence on the fertilizing ability of sperm.

KEY WORDS: ejaculate, calcium, potassium, sodium, fertilizing ability of sperm.

Отримано 22.05.12

Адреса для листування: Г. В. Максимюк, вул. Енергетична, 24, кв. 39, Львів-26, 79026, Україна, e-mail: hanna.maksymjuk@gmail.com.

**ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ Й ОФТАЛЬМОНЕШКІДЛИВІСТЬ
ОЧНОЇ ЛІКАРСЬКОЇ МАЗІ З ЛІЗОЦИМОМ**

Досліджено фізико-хімічні властивості очної лікарської мазі з лізоцимом пролонгованої бактеріолітичної дії з використанням як основи безводного ланоліну і вазеліну (1:4). Показано повне збереження гідролітичної активності ферменту (20 000 од./г мазі) і фізико-хімічних характеристик лікарської форми протягом 3 років зберігання (4 °С). Дослідження гострої офтальмотоксичності препарату і кон'юнктивальної проби на очах кролів і морських свинок показало, що 0,25 % мазь лізоциму не чинить місцевоподразнювальної і алергізувальної дій.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: очна мазь, лізоцим, офтальмотоксичність, ланоліно-вазелінова основа.

ВСТУП. Очні лікарські форми займають особливе місце серед широкого асортименту препаратів, які застосовують у практичній офтальмології. Захворюваність населення України на очну патологію, за статистичними даними, становить 56 % у великих містах і близько 49 % в сільській місцевості [4]. Провідне місце серед них займають запальні інфекційні ураження очей, збудниками яких є багато мікроорганізмів і деякі віруси.

Враховуючи зростання резистентності мікроорганізмів до антибіотиків, перспективним є використання лізоциму, ферменту класу гідролаз, який має протизапальну, імунокоригувальну, бактеріолітичну й адаптаційно-трофічну дії. Очні лікарські препарати у вигляді мазей або гелей характеризуються пролонгованим терапевтичним ефектом, високою біодоступністю, досить легкою технологією виготовлення, безпечністю і простотою застосування.

Для приготування очних мазей широко застосовують основу, що складається з ланоліну безводного і вазеліну [1]. У даній основі ланолін сприяє фіксації мазі на слизовій, а також більш повному всмоктуванню лікарських речовин, а вазелін має достатню стійкість до впливу зовнішнього середовища, індиферентність відносно багатьох лікарських речовин, відсутність подразнювальної дії [2, 3, 6].

Метою даної роботи було вивчити фізико-хімічні властивості очної лікарської мазі з лізоцимом і офтальмонешкідливість препарату.

© І. І. Романовська, О. П. Сотникова, С. С. Декіна, Є. А. Шестеренко, 2012.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. У роботі використовували комерційний препарат лізоциму яєчного білка КФ 3.2.1.17 ("Merck", Німеччина), ланоліну безводного, вазеліну "Для очних мазей", що не містить відновлювальних речовин.

Мазь готували таким чином: 1 г ланоліну і 4 г вазеліну розміщували у фарфоровій чашці й нагрівали на водяній бані; розплавлену мазеву основу проціджували через кілька шарів марлі, фасували в сухі простерилізовані скляні флакони, закупорювали і стерилізували в повітряному стерилізаторі при 180 °С протягом 30 хв; у готову мазеву основу (5 г) поступово вмішували водний розчин лізоциму, що містить 12,5 мг ферменту, до отримання гомогенної в'язкої суміші (без крапельок води) і зберігали при температурі 3–5 °С в захищеному від світла місці.

Гідролітичну активність лізоциму визначали бактеріолітичним методом, використовуючи як субстрат ацетоновий порошок *Micrococcus lysodeikticus* (штам 2665) [5]. За одиницю активності лізоциму брали кількість ферменту, що сприяє зниженню оптичної густини суспензії клітин на 0,001 за 1 хв.

Вміст білка і динаміку його виходу з препарату контролювали методом Лоурі–Хартрі [8]. рН-оптимум лізоциму, включеного в мазеву основу і вільного, визначали, доливаючи до рівних за активністю проб розчин субстрату і буферні розчини з різними значеннями рН (2,0–10,0) з наступним визначенням активності за вищевказаною методикою. Температурний оптимум препарату визначали в однакових за активністю пробах вільного і

включеного в мазеву основу лізоциму при температурі 20–80 °С в Na-фосфатному буферному розчині 0,1 М, рН 6,2. Термін придатності препарату оцінювали протягом 3 років за показниками його гідролітичної активності та фізико-хімічних властивостей.

Офтальмонешкідливість 0,25 % очної мазі лізоциму вивчали з метою встановлення наявності, характеру і ступеня вираження можливого її токсичного впливу на зовнішні структури ока. Оцінювали показники гострої офтальмотоксичності й дані кон'юнктивальної проби (алергізувальна дія). Дослідження проведено згідно з вимогами GLP, методичних рекомендацій ДФЦ МОЗ України (2003). Досліди виконано на 12 статевозрілих кролях породи шиншила обох статей масою 2,2–2,8 кг і 6 морських свинках масою 300–350 г. Гостру офтальмотоксичність вивчали в режимі багаторазового закладання смужки 0,25 % мазі лізоциму довжиною 0,5–1 см у нижнє кон'юнктивальне склепіння правого ока кролика через кожну годину протягом 6 год. Ліве око використовували як інтактний контроль. Контрольній групі тварин у праве око закладали мазеву основу. Показниками гострої офтальмотоксичності слугували дані про вплив випробуваної мазі на структури переднього відділу ока – рогівку, райдужну оболонку і кон'юнктиву (місцевоподразнювальна дія), які оцінювали за шкалою Дрейза (в балах). Цілісність епітелію рогівки визначали за флуоресцеїновою пробою. Всі досліджувані показники реєстрували при зовнішньому огляді та методом біомікроскопії на щілинній лампі ЩЛ-2Б перед початком введення очної мазі, після закінчення її використання і через 24 год після початку застосування. Кожен кролик враховувався окремо за сумою балів у трьох блоках: “рогівка + райдужка + кон'юнктива”. Тест Дрейза оцінювали як позитивний, якщо

сума балів перевищувала 20. Алергізувальну дію вивчали на морських свинках з метою з'ясування можливої сенсibiliзувальної дії очної мазі; в праве око закладали 0,25 % мазь лізоциму, а в ліве (контрольне) – мазеву основу. Можливу реакцію враховували при зовнішньому огляді через 15 хв і через 24–48 год, оцінюючи її в балах. Пробу вважали позитивною, якщо після введення мазі реєстрували реакцію в 1 бал і вище [7].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Для дослідження було підготовлено 35 флаконів, кожен з яких містив 5 г 0,25 % мазі лізоциму, відповідно до концентрації ферменту, який використовують в офтальмології. У зразках визначали вміст ферменту, білка в препараті на момент виготовлення і в процесі зберігання. Характеристику мазі наведено в таблиці 1.

Швидкість і повноту вивільнення лізоциму з мазі показано на рисунку. Встановлено, що максимальний вихід ферменту спостерігається через 5 годин інкубування і становить $(49,2 \pm 1,3)$ %. Подальше витримування мазі протягом доби не приводить до повного вивільнення білка або збільшення гідролітичної активності, що, очевидно, пов'язано зі здатністю ланоліну до емульгування та інгібуючим впливом маzewої основи.

При встановленні терміну придатності досліджуваного препарату показано повне збереження гідролітичної активності ферменту і всіх фізико-хімічних характеристик очної форми протягом 3 років зберігання (табл. 2).

Офтальмонешкідливість 0,25 % очної мазі лізоциму вивчали з метою встановлення наявності, характеру і ступеня вираження можливого її токсичного впливу на зовнішні структури ока. На всіх етапах експерименту і після закінчення шестигодинного застосування мазі у кролів дослідної групи стан рогівки і рай-

Таблиця 1 – Фізико-хімічні властивості мазі лізоциму

Властивості	Характеристика
Згідно з класифікацією за сферою використання за складом за характером впливу на організм за типом дисперсної системи за типом маzewої основи	Мазь для нанесення на слизову оболонку. Очні мазі. Складна. Місцева. Гетерогенна комбінована. Гідрофобна. Вуглеводнева
Колір	Кремовий
Маса, г	5
Гідролітична активність*, од.	$20\,000 \pm 1500$
рН-оптимум дії	6,0–6,5
Термооптимум, °С	55
Вміст білка, %	55
Активність при 37 °С	75 % від вих.

Примітка. * – Na-фосфатний буферний розчин, рН 6,2, Т=55 °С.

Таблиця 2 – Збереження активності мазі лізоциму

Час зберігання, міс.	Гідролітична активність*	
	од./мг	%
Після включення	20773±1038	100,0
1	20770±1039	99,98
3	20673±1034	99,52
6	19215±961	92,50
12	20038±1002	96,46
36	20138±1052	96,94

Примітка. * – гідролітична активність лізоциму при pH 6,2, T=55 °C.

дужної оболонки зберігався на вихідному фізіологічному рівні. Мазева основа (контроль) не викликала симптомів подразнення з боку кон'юнктиви повік кролів.

Аналіз результатів місцевої реакції на застосування препарату (дослідна група) показав, що в жодного з кролів у блоці "рогівка + райдужка + кон'юнктивна" сумарна оцінка не перевищувала 6 балів. Таким чином, тест Дрейза є негативним і мазь лізоциму не має місцевоподразнювальної дії.

За результатами кон'юнктивальної проби у морських свинок, після однократного закладання мазі лізоциму (в праве око) при зовнішньому огляді стан обох очей відповідав фізіологічній нормі. Через 15 хв і через 24–48 год не виявлено будь-яких видимих змін кон'юнктиви очного яблука і склери, що дозволяє оцінювати кон'юнктивальну пробу як негативну і свідчить про відсутність алергізувальної дії очної мазі.

ВИСНОВКИ. Розроблено 0,25 % очну мазь лізоциму на ланоліно-вазелиновій основі з

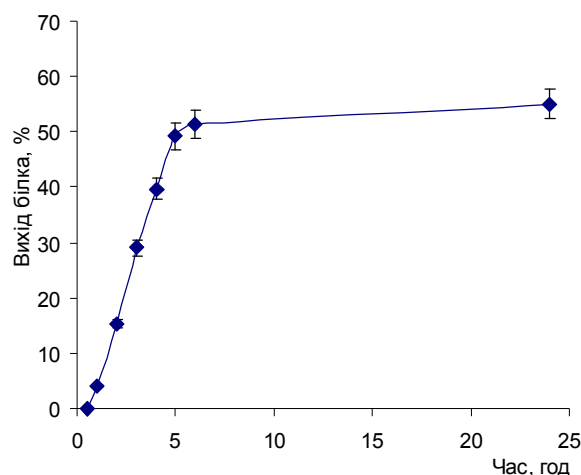


Рис. Динаміка виходу лізоциму з ланоліно-вазелинової мазевої основи.

високим збереженням гідролітичної активності та фізико-хімічних властивостей протягом тривалого терміну зберігання (3 роки). Дослідження офтальмонешкідливості препарату показали відсутність місцевоподразнювальної та алергізувальної дій.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Державна Фармакопея України / Державне підприємство "Науково-експертний фармакопейний центр". – 1-ше вид. – Х. : РІПЕГ, 2001. – 556 с.
2. Николаев Н. П. Технология мазей / Н. П. Николаев. – К. : МОРИОН, 1998. – 250 с.
3. Про затвердження Правил виробництва (виготовлення) лікарських засобів в умовах аптеки : наказ МОЗ України № 626 від 15.12.2004 р.
4. Салдан В. И. Фармакологическое исследование совместного применения гумината и сульфацила натрия при заболеваниях роговицы : автореф. дисс. на соискание ученой степени канд. биол. наук / В. И. Салдан. – Одесса, 2008. – 19 с.
5. Ткачук Н. И. Биохимические изменения в тканях полости рта крыс при воспроизведении

стоматита с помощью пчелиного яда / Н. И. Ткачук, В. Я. Скиба, А. П. Левицкий // Вісник стоматології. – 2007. – № 6. – С. 16–20.

6. Фармацевтические и биологические аспекты мазей : монография / [И. М. Перцев, А. М. Котенко, О. В. Чуешов и др.]. – Х. : Вид-во НФаУ; Золотые страницы, 2003. – 285 с.

7. Экспериментальное изучение безвредности и фармакологической активности глазных лекарственных средств : методические рекомендации / [Л. А. Чайка, А. Г. Ципкун, Т. Б. Гайдамака и др.]. – К., 2003. – 43 с.

8. Hartree E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response / E. F. Hartree // Anal. Biochem. – 1972. – 48, № 1. – P. 422–427.

И. И. Романовская¹, Е. П. Сотникова², С. С. Декина¹, Е. А. Шестеренко¹
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ ИМЕНИ А. В. БОГАТСКОГО НАН УКРАИНЫ¹, ОДЕССА
ИНСТИТУТ ГЛАЗНЫХ БОЛЕЗНЕЙ И ТКАНЕВОЙ ТЕРАПИИ ИМЕНИ В. П. ФИЛАТОВА НАМН УКРАИНЫ², ОДЕССА

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ОФТАЛЬМОБЕЗВРЕДНОСТЬ ГЛАЗНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ МАЗИ С ЛИЗОЦИМОМ

Резюме

Исследованы физико-химические свойства глазной лекарственной мази с лизоцимом пролонгированного бактериолитического действия с использованием в качестве основы безводного ланолина и вазелина (1:4). Показано полное сохранение гидролитической активности фермента (20 000 ед./г мази) и физико-химических характеристик лекарственной формы на протяжении 3 лет хранения (4 °С). Исследование острой офтальмотоксичности препарата и конъюнктивной пробы на глазах кроликов и морских свинок показало, что 0,25 % мазь лизоцима не обладает местнораздражающим и аллергизирующим действиями.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: глазная мазь, лизоцим, офтальмотоксичность, ланолино-вазелиновая основа.

I. I. Romanovska¹, O. P. Sotnykova², S. S. Dekina¹, Ye. A. Shesterenko¹
O. V. BOHATSKYI PHYSICO-CHEMICAL INSTITUTE OF NAS OF UKRAINE¹, ODESA
FILATOV INSTITUTE OF EYE DISEASES AND TISSUE THERAPY², ODESA

PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES AND OPHTHALMOINNOCECE OF OCULAR MEDICINAL OINTMENT WITH LYSOZYME

Summary

There were studied the physico-chemical properties of ocular medicinal ointment with lysozyme is produced, possessing prolonged bacteriolytic action, using as base anhydrous lanolin and vaseline (1: 4). The total retaining of enzyme hydrolytic activity (2000 U/g of ointment) and physico-chemical properties of medicinal form during 3 years of storage (4 °C) is shown. Investigation of acute ophthalmotoxicity of preparation and conjunctival test on eyes of rabbits and guinea pigs has shown, that 0,25 % lysozyme ointment has no locally irritative and allergenic action.

KEY WORDS: ocular ointment, lysozyme, ophthalmotoxicity, lanolin-vaseline base.

Отримано 27.06.12

Адреса для листування: І. І. Романовська, Фізико-хімічний інститут імені О. В. Богатського НАН України, Люстдорфська дорога, 86, Одеса, 65080, Україна, e-mail: romairina@gmail.com.

**ЗМІНИ ПОКАЗНИКІВ НЕСПЕЦИФІЧНОЇ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ОРГАНІЗМУ
ПРИ ТЯЖКІЙ ТА КОМБІНОВАНІЙ ТРАВМІ**

Стаття присвячена вивченню ролі імунної системи в патогенезі тяжкої і комбінованої травми. Досліджено показники неспецифічної резистентності організму за умов моделювання травми з додатковим механічним пошкодженням та опіком шкіри. Показано, що моделювання тяжкої і комбінованої травми призводить до порушення неспецифічної резистентності організму. Зокрема, знижуються активність комплементу і вміст лізоциму, пригнічення фагоцитарної здатності нейтрофільних лейкоцитів найбільш виражене на 7-му добу спостереження в опечених травмованих тварин 3-ї дослідної групи.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: тяжка і комбінована травма, неспецифічна резистентність організму, комплемент, лізоцим, нейтрофільні лейкоцити.

ВСТУП. Актуальність дослідження механізмів розвитку порушень захисних функцій при травмі визначається зростанням рівня травматизму в суспільстві, який супроводжується посиленням тяжкості пошкоджень з тенденцією до збільшення множинних та комбінованих травм [11]. За сучасних умов травма є однією з основних причин смертності молодії і найбільш працездатної частини населення. Незважаючи на те, що патофізіологічні та імунологічні аспекти патогенезу перебігу травматичної хвороби систематично вивчають, особливості розвитку захисних реакцій при травматичних пошкодженнях вимагають подальших детальних досліджень.

Вивчення перебігу тяжкої травматичної хвороби дозволило встановити, що імунна система має високу чутливість до різних екстремальних факторів фізичної природи, до яких відносять і механічні пошкодження [5, 7, 8, 13, 15]. Тому закономірний наслідок травми – зміни активності функцій імунної системи, які стають причиною ускладнень інфекційного генезу. Реакція імунної системи на травму починається вже в перші хвилини після неї; вираження імунологічних порушень та їх тривалість залежать від сили і часу дії, а також від масштабу пошкодження тканин. При тяжкій травмі, яка супроводжується розвитком травматичного шоку, відразу після дії екстремального фактора на організм спостерігається порушення взаємодії імунної та нейроендокринної систем, у тому числі посилення секреції гормонів надниркових залоз, які впливають на клітинну та гуморальну ланки імунітету. Ці

зміни визначають у подальшому перебіг та наслідки травми [1, 5, 12].

Імунологічні зміни при тяжких травматичних пошкодженнях викликають індуковану форму вторинного імунодефіцитного стану, який супроводжується пригніченням функцій клітинної ланки імунітету і факторів неспецифічного захисту, що характеризуються змінами активності комплементу та вмісту лізоциму, а також пригніченням фагоцитарної активності нейтрофілів крові [2, 3, 5, 9, 10, 14].

Таким чином, наслідком тяжкої і комбінованої травми є порушення захисних функцій організму. Дослідження механізмів цих порушень, очевидно, дозволить прогнозувати ризик розвитку і генералізації інфекційних ускладнень ще до їх клінічної маніфестації.

Метою даної роботи було вивчити вплив тяжкої травми з додатковим механічним дефектом та опіком шкіри на неспецифічну резистентність організму, в тому числі активність комплементу і вміст лізоциму, фагоцитарну активність нейтрофілів крові.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. В експерименті використано 60 нелінійних білих щурів масою 180–200 г. У 1-й серії експерименту в асептичних умовах під легким ефірним наркозом моделювали тяжку травму, яка передбачала перелом стегнової кістки, кровотечу зі стегнової вени і введення автокрові у паранефральну клітковину з розрахунку 1 мл на 100 г маси тварини [6]. У 2-й групі додатково на депільованій поверхні спини викроювали шкірний клапоть площею близько 10 % поверхні шкіри. На рану накладали стерильну пов'язку. З 3-ї

доби рану вели відкритим способом. У тварин 3-ї групи моделювали опік III А ступеня на аналогічній ділянці депільованої спини за методикою [16] у нашій модифікації, відповідно до якої в умовах ефірного знеболювання до депільованої поверхні спини прикладали мідну пластинку площею 28 см², попередньо занурену в киплячу воду не менше ніж на 10 хв. Щурів утримували ізольовано одна від одної. Контрольну групу склали інтактні тварини, яких утримували в стандартних умовах віварію. Декапітацію щурів проводили під легким ефірним наркозом на 1-шу, 3-тю та 7-му доби експерименту, дотримуючись принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986). Для дослідження використовували сироватку крові. Активність комплементу визначали за методикою [4] на спектрофотометрі СФ – 46, вміст лізоциму визначали за методикою [4] і фотометрували при 540 нм, фагоцитарну активність нейтрофільних лейкоцитів – за методикою [4]. При оцінюванні фагоцитарної реакції враховували: 1) відсоток фагоцитозу – відсоток фагоцитуючих клітин відносно загальної кількості нейтрофільних лейкоцитів; 2) фагоцитарний індекс – середнє число мікробів, захоплених одним нейтрофільним лейкоцитом.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. У таблицях 1 і 2 наведено результати вивчення впливу тяжкої травми з додатковим механічним дефектом та опіком шкіри на неспецифічну

резистентність організму – активність у плазмі крові комплементу та вміст лізоциму. Через добу з моменту моделювання тяжкої травми (1-ша дослідна група) активність комплементу в плазмі крові знизилась в 1,5 раза, на 3-тю і 7-му доби досліді цей показник продовжував зменшуватися (у 2 та 2,2 раза) порівняно з інтактними тваринами. Різке достовірне зниження титру комплементу в усі доби спостереження (у 2,5, 2,8 та 3 рази) ми зафіксували в щурів із тяжкою травмою з додатковим опіком шкіри (3-тя дослідна група). Дещо менш виражені зміни даного показника (порівняно з 3-ю групою) виявлено у травмованих тварин з додатковим механічним дефектом шкіри (2-га дослідна група). Активність комплементу в щурів цієї групи знижувалася, відповідно, у 2,1, 2, 4 та 2,7 раза на 1-шу, 3-тю і 7-му доби експерименту. Виявлені нами зміни активності комплементу закономірні, оскільки більшість його компонентів синтезується у печінці.

Після травмування тварин спостерігалось також зниження концентрації лізоциму в плазмі крові піддослідних тварин. Через 24 год з моменту моделювання тяжкої травми (1-ша, 2-га і 3-тя дослідні групи) вміст лізоциму в плазмі крові зменшився, порівняно з інтактними тваринами, на 25 % ($p>0,05$), 39,4 та 41,8 % ($p<0,001$) відповідно. До 3-ї та 7-ї діб вміст лізоциму продовжував достовірно знижуватися. Як і у випадку з комплементом, найбільш виражене зменшення концентрації лізоциму зафіксовано на 7-му добу у тварин 3-ї дослідної групи.

Таблиця 1 – Показники активності комплементу (СН₅₀) в плазмі крові щурів на тлі тяжкої травми, обтяженої механічним пошкодженням та опіком шкіри

Модель досліді	Показник	Група тварин			
		інтактні	травмовані		
			1-ша доба	3-тя доба	7-ма доба
Політравма	Комплемент	27,16±1,54	17,9±0,96 $p<0,001$	13,64±0,7 $p<0,001$	11,91±0,61 $p<0,001$
Політравма+рана	Комплемент	27,16±1,54	12,93±0,51 $p<0,001$	11,23±0,38 $p<0,001$	10,06±0,61 $p<0,001$
Політравма+опік	Комплемент	27,16±1,54	10,78±0,25 $p<0,001$	9,78±0,25 $p<0,001$	8,86±0,22 $p<0,001$

Таблиця 2 – Показники вмісту лізоциму (мкг/мл) в плазмі крові щурів на тлі тяжкої травми, обтяженої механічним пошкодженням та опіком шкіри

Модель досліді	Показник	Група тварин			
		інтактні	травмовані		
			1-ша доба	3-тя доба	7-ма доба
Політравма	Лізоцим	4,66±0,29	3,54±0,77 $p>0,05$	2,56±0,19 $p<0,001$	2,38±0,06 $p<0,001$
Політравма+рана	Лізоцим	4,66±0,29	2,82±0,11 $p<0,001$	2,78±0,22 $p<0,001$	2,42±0,12 $p<0,001$
Політравма+опік	Лізоцим	4,66±0,29	2,71±0,11 $p<0,001$	2,3±0,09 $p<0,001$	1,92±0,09 $p<0,001$

Можливо, отримані нами факти зниження під впливом ендотоксинів, які утворюються внаслідок тяжкої травми, обтяженої або механічним дефектом, або опіком шкіри, вмісту лізоциму в піддослідних тварин є наслідком їх токсичного впливу на лейкоцити, які даний фермент синтезують. Таке припущення підтверджується даними, наведеними у таблиці 3. З їх аналізу випливає, що політравматичне ураження супроводжується суттєвим пригніченням фагоцитарної активності нейтрофілів крові. Через добу з моменту травмування (1-ша дослідна група) кількість стафілококів, фагоцитованих нейтрофілами крові, була в 2,2 раза

нижчою, ніж аналогічний показник здорових тварин. У 2 рази зменшувався також відсоток фагоцитуючих лейкоцитів. У тварин 2-ї та 3-ї дослідних груп досліджувані показники у цей термін спостереження були достовірно нижчими у 2,5 рази. До 7-ї доби спостерігалось подальше зменшення показників функціональної активності нейтрофільних лейкоцитів крові щурів. Фагоцитарне число у тварин 1-ї дослідної групи на 7-му добу спостереження було достовірно нижчим у 2,6 рази від рівня інтактних тварин, 2-ї та 3-ї груп – в 3 рази. Відсоток фагоцитуючих лейкоцитів найістотніше зменшувався у щурів 3-ї дослідної групи і був нижчим від рівня інтактних тварин у 3 рази.

Таблиця 3 – Показники активності нейтрофілів крові щурів на тлі тяжкої травми, механічного пошкодження та опіку шкіри

Модель досліджу	Показник	Група тварин			
		інтактні	травмовані		
			1-ша доба	3-тя доба	7-ма доба
Політравма	Фагоцитарне число	3,34±0,14	1,51±0,09 p<0,001	1,41±0,08 p<0,001	1,29±0,06 p<0,001
	% фагоцитуючих лейкоцитів	33,88±1,09	17,01±1,06 p<0,001	15,36±0,74 p<0,001	13,58±0,59 p<0,001
Політравма+рана	Фагоцитарне число	3,34±0,14	1,36±0,11 p<0,001	1,21±0,09 p<0,001	1,13±0,01 p<0,001
	% фагоцитуючих лейкоцитів	33,88±1,09	13,71±0,87 p<0,001	12,86±0,32 p<0,001	11,58±0,33 p<0,001
Політравма+опік	Фагоцитарне число	3,34±0,14	1,34±0,06 p<0,001	1,26±0,04 p<0,001	1,14±0,08 p<0,001
	% фагоцитуючих лейкоцитів	33,88±1,09	14,1±0,54 p<0,001	12,16±0,32 p<0,001	11,26±0,54 p<0,001

ВИСНОВКИ. 1. Моделювання тяжкої і комбінованої травми призводить до порушення неспецифічної реактивності організму. Зокрема, відбуваються зниження активності комплементу і вмісту лізоциму, пригнічення фагоцитарної здатності нейтрофільних лейкоцитів.

2. Найістотніше достовірне зниження активності комплементу (у 3 рази) та концен-

трації лізоциму спостерігалось через тиждень після моделювання тяжкої травми з додатковим опіком 10 % шкіри.

3. Відсоток фагоцитуючих лейкоцитів найістотніше зменшувався у тварин 3-ї дослідної групи і був нижчим від рівня інтактних тварин у 3 рази.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Зайчик А. Ш. Стресс: интегральный неспецифический защитный ответ // Общая патофизиология (с основами иммунопатологии) / А. Ш. Зайчик, Л. П. Чурилов ; под ред. А. Ш. Зайчика, Л. П. Чурилова. – СПб., 2005. – С. 520–588.
2. Злакоманова О. Н. Регуляторные эффекты цитокинов при исследовании двигательных функций фагоцитов у детей с травматической болезнью / О. Н. Злакоманова, А. В. Чукичев, А. В. Зурочка // Цитокины и воспаление. – 2006. – 5, № 2. – С. 30–36.
3. Козлов В. К. Сепсис: этиология, иммунопатогенез, концепция современной иммунотерапии / В. К. Козлов. – СПб., 2006. – 304 с.

4. Козлюк А. С. Иммунологические методы в гигиенических исследованиях / А. С. Козлюк, Л. А. Анисимов, И. Г. Шройт. – Кишинев : Штиинца, 1987. – 115 с.

5. Новиков В. С. Иммунофизиология экстремальных состояний / В. С. Новиков, В. С. Смирнов. – СПб., 1995. – 172 с.

6. Пат. на корисну модель 30028 Україна, МПК 2006 G 09 B 23/00. Спосіб моделювання політравми / Секела Т. Я., Гудима А. А. ; Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського. – № U 2007 10471 ; заявл 21.09.07 ; опубл. 11.2.08 ; Бюл. № 3. – 4 с.

7. Рыбакина Е. Г. Физиологическая роль интерлейкина-1 в механизмах развития стрессорной реакции / Е. Г. Рыбакина, Е. А. Корнева // Мед. акад. журн. – 2002. – **2**, № 2. – С. 4–17.

8. Травма: воспаление и иммунитет / Н. М. Калинина, А. Е. Сосюкин, Д. А. Вологжанин [и др.] // Цитокины и воспаление. – 2005. – **4**, № 1. – С. 28–34.

9. Травматическая болезнь и ее осложнения / под ред. С. А. Селезнева, С. Ф. Багненко, Ю. Б. Шапота, А. А. Курыгина. – СПб., 2004. – 414 с.

10. Фрейдлин И. С. Прикладные аспекты современного учения о цитокинах : лекции / И. С. Фрейдлин // Тихоок. мед. журн. – 1999. – № 3. – С. 13–19.

11. Цыбуляк Г. Н. Лечение тяжелых и сочетанных повреждений : руководство / Г. Н. Цыбуляк. – СПб., 1995. – 432 с.

12. Чурилов Л. П. Проблема соотношения повреждения и защиты в патологии // Общая патофизиология (с основами иммунопатологии) / Л. П. Чурилов ; под ред. А. Ш. Зайчика, Л. П. Чурилова. – СПб., 2005. – С. 26–30.

13. Changes in blood lymphocyte populations after multiple trauma: association with posttraumatic complications / T. Menges, J. Engel, I. Welters [et al.] // Crit. Care Med. – 1999. – **27**, № 4. – P. 733–740.

14. Idem A. The Role of Interleukin-1 in Stress-Induced Changes in Immune System Function / A. Idem // Neurosci. Behav. Physiol. – 2001. – **31**, № 4. – P. 431–438.

15. Patterns of cytokine evolution (tumor necrosis factoralpha and interleukin-6) after septic shock, hemorrhagic shock, and severe trauma / C. Martin, C. Boisson, M. Haccoun [et al.] // Ibid. – 1997. – **25**, № 11. – P. 1813–1819.

16. Regas F. C. Elucidating the vascular response to burns with a new rat model / F. C. Regas, H. P. Ehrlich // J. Trauma. – 1992. – **32**, № 5. – P. 557–563.

С. Р. Пидручная, У. М. Захарчук, Е. О. Кулянда

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

ИЗМЕНЕНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ОРГАНИЗМА ПРИ ТЯЖЕЛОЙ И КОМБИНИРОВАННОЙ ТРАВМЕ

Резюме

Статья посвящена изучению роли иммунной системы в патогенезе тяжелой и комбинированной травмы. Исследованы показатели неспецифической резистентности организма в условиях моделирования травмы с дополнительным механическим повреждением и ожогом кожи. Показано, что моделирование тяжелой и комбинированной травмы приводит к нарушению неспецифической резистентности организма. В частности, снижаются активность комплемента и содержание лизоцима, угнетение фагоцитарной способности нейтрофильных лейкоцитов наиболее выражено на 7 сутки наблюдения у травмированных животных 3-й опытной группы с дополнительным ожогом кожи.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: тяжелая и комбинированная травма, неспецифическая резистентность организма, комплемент, лизоцим, нейтрофильные лейкоциты.

S. R. Pidruchna, U. M. Zaharchuk, O. O. Kulianda
I. YA. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

CHANGES OF INDICES OF NON-SPECIFIC RESISTANCE OF THE ORGANISM AT SEVERE AND COMBINED TRAUMA

Summary

The article adduces the role of immune system in pathogenesis of severe and combined trauma. There were studied the indices of non-specific resistance of organism in the conditions of modelling of trauma with extra mechanic lesion and skin burn. It was set that the modelling of severe and combined trauma leads to disorder of non-specific reactivity of organism. In particular, there is occurred the decrease of activity of complement and lyzocyme content, depression of phagocutic ability of neutrophilic leukocytes is the most expressive on the 7th day of observation in burnt injured animals of the third experimental group.

KEY WORDS: severe and combined trauma, non-specific resistance of organism, complement, lyzocyme, neutrophilic leukocytes.

Отримано 17.07.12

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

Т. В. Ніколаєнко, І. В. Бесараб, Г. О. Почтарьова, Х. Д. Непийвода,
К. В. Лаврова, Ю. А. Ступак, Л. І. Томачинська, Л. В. Гарманчук
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

ВПЛИВ ІОНІВ СВИНЦЮ НА ПОКАЗНИКИ ГЕПАТОБІЛІАРНОЇ СИСТЕМИ ТА АЗОТИСТОГО КАТАБОЛІЗМУ

Зафіксовано зниження рівня сечовини (на $(19 \pm 2) \%$, $p < 0,05$), підвищення рівня сечової кислоти (в середньому на $(15 \pm 3) \%$, $p < 0,05$) і білірубину (в 1,5 раза, $p < 0,05$) в сироватці крові щурів за впливу іонів свинцю порівняно з контрольною групою тварин. Застосування біологічної добавки (сочевиця та сорбент "Літовіт") нормалізує вищевказані показники, що свідчить про позитивний коригувальний вплив даної біологічної добавки до раціону. Отримані результати можуть слугувати основою для рекомендацій щодо використання антиоксидантів та препарату-сорбенту як супроводжувальної терапії при патологічних станах, викликаних отруєнням важкими металами.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: іони свинцю, сечовина, сечова кислота, білірубін, препарат "Літовіт", сочевиця.

ВСТУП. Накопичення свинцю призводить до розвитку ряду біохімічних змін в організмі тварин і людини, а період його виведення з організму досить тривалий. Тому для поглиблення уявлень про механізми впливу важких металів на організм важливим є дослідження біохімічних показників крові, які характеризують ферментний, білковий і вуглеводний обміни [4, 5, 8]. Біохімічні механізми токсичної дії свинцю пов'язані з незворотним інгібуванням більшості ферментів, особливо енергетичного катаболізму та гемовмісних ензимів [3]. Відомо також, що іони важких металів, у тому числі й свинцю, активують процеси утворення активних форм кисню в різних типах клітин, провокуючи розвиток в організмі оксидативного стресу. Тому важливу роль у запобіганні зумовленим катіонами свинцю токсичним ефектам відіграють антиоксиданти [2]. Для корекції пошкоджень, викликаних іонами свинцю, використовували препарат "Літовіт", який рекомендують приймати для виведення продуктів метаболізму з організму, радіоактивних і токсичних речовин, нормалізації мінерального обміну, а також сочевицю, яка є абсолютно екологічною, оскільки не накопичує ніяких токсичних елементів, нітратів і радіонуклідів [6].

Мета даної роботи полягала в дослідженні показників гепатобіліарної системи та азотистого катаболізму під впливом іонів свинцю та за умов використання антиоксидантів.

© Т. В. Ніколаєнко, І. В. Бесараб, Г. О. Почтарьова, Х. Д. Непийвода, К. В. Лаврова, Ю. А. Ступак, Л. І. Томачинська, Л. В. Гарманчук, 2012.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. В експерименті використовували білих статевозрілих нелінійних щурів-самок масою 200–250 г розведення віварію ННЦ "Інститут біології" Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Летальна доза ацетату свинцю для щурів (LD_{100}) становить 250 мг/кг маси тіла [2]. Щурам вводили ацетат свинцю в концентраціях, що відповідали $LD_{100}/2$ та $LD_{100}/5$, внутрішньочеревно дробно один раз на добу протягом 5 днів [1]. Тварин було поділено на 7 груп по 5 особин у кожній: контроль (інтактні тварини); плацебо (щурам вводили фізіологічний розчин); 2 групам тварин вводили свинець у дозах $LD_{100}/5$ та $LD_{100}/2$ відповідно; 3 групи тварин, крім стандартного раціону, додатково отримували сочевицю та препарат-сорбент "Літовіт" (плацебо+; $LD_{100}/5+$; $LD_{100}/2+$). Всі досліди на щурах проводили відповідно до правил роботи з експериментальними тваринами [7]. Для визначення рівня сечовини, сечової кислоти та білірубину в сироватці крові використовували стандартні діагностичні набори фірми "Філісіт-Діагностика" згідно з рекомендаціями виробника.

Отримані результати досліджень обробляли статистично з використанням t-критерію Стьюдента та комп'ютерної програми "Microsoft Excel".

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. В результаті проведених досліджень під впливом іонів свинцю було виявлено зниження рівня сечовини в сироватці крові щурів порівняно

з інтактними тваринами та групою “плацебо” (рис. 1).

Введення щурам ацетату свинцю в дозах $LD_{100}/5$ та $LD_{100}/2$ спричиняло зменшення досліджуваного показника до (84 ± 4) та (79 ± 6) % ($p < 0,05$) від рівня в контрольній групі й до (89 ± 5) та (84 ± 3) % ($p < 0,05$) – в групі “плацебо” відповідно.

Було показано, що у групі $LD_{100}/5$ комбінована дія сочевиці та препарату “Літовіт” не викликала достовірних змін рівня сечовини в сироватці крові щурів, тоді як у групі тварин, яким вводили свинець у дозі $LD_{100}/2$, виявлено збільшення даного показника на (22 ± 2) % ($p < 0,05$) порівняно з відповідною групою на стандартному раціоні.

Що стосується рівня сечової кислоти в сироватці крові, то введення ацетату свинцю в дозі $LD_{100}/2$ спричиняло збільшення цього показника на (23 ± 4) % ($p < 0,05$), в групі $LD_{100}/5$ – на (12 ± 2) % ($p < 0,05$) порівняно з показником у інтактних тварин (рис. 2). Водночас у щурів, які споживали сочевицю та препарат “Літовіт” на тлі введення ацетату свинцю в дозах $LD_{100}/5$ і $LD_{100}/2$, було встановлено зменшення вмісту сечової кислоти в сироватці крові на (20 ± 3) та (33 ± 2) % ($p < 0,05$) відповідно порівняно з групами тварин на стандартному раціоні.

При визначенні основного показника гепатобіліарної системи – білірубину в сироватці крові щурів було виявлено зміни, які наведено на рисунку 3. Так, у групі плацебо рівень білірубину не зазнав достовірних змін. Водночас було показано збільшення цього показника на 55 та 37 % у щурів, яким вводили свинець у дозах $LD_{100}/2$ і $LD_{100}/5$ відповідно.

З метою пошуку шляхів корекції пошкоджувальної дії свинцю його вплив на гепатобі-

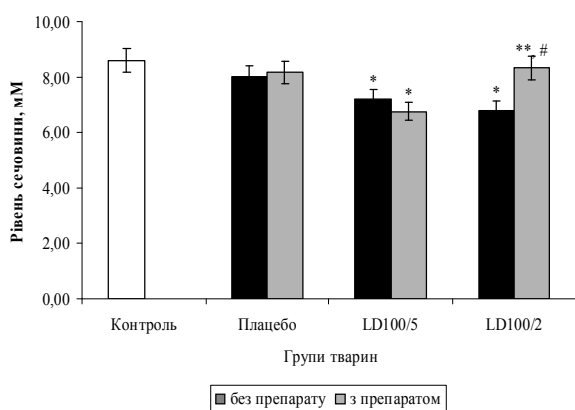


Рис. 1. Вміст сечовини в сироватці крові щурів за умов споживання сочевиці та препарату “Літовіт” на тлі введення ацетату свинцю у дозах $LD_{100}/5$ і $LD_{100}/2$: * – $p < 0,05$ порівняно з контролем; ** – $p < 0,05$ порівняно з плацебо; # – $p < 0,05$ порівняно з відповідною групою без сочевиці та препарату “Літовіт”.

ліарну систему вивчали також на фоні споживання тваринами антиоксиданта (сочевиці) та препарату-сорбенту “Літовіт”. В результаті проведених досліджень встановлено, що у групі “плацебо” відбувалось незначне зниження рівня порівняно з показником у щурів на стандартному раціоні. При споживанні зазначеної добавки на тлі введення ацетату свинцю в дозах $LD_{100}/2$ та $LD_{100}/5$ також було встановлено зменшення вмісту білірубину в сироватці на (50 ± 4) і (48 ± 2) % відповідно порівняно з тваринами на стандартному раціоні.

Такі результати можна пояснити перш за все адсорбуючими властивостями цеоліту, що входить до складу препарату “Літовіт”. По-перше, сорбент поглинає та затримує іони свинцю і, можливо, білірубін у кишечнику. По-друге, не менш важливими є антиоксидантна та адсорбуюча дії сочевиці. Це може бути передумовою для рекомендацій щодо ком-

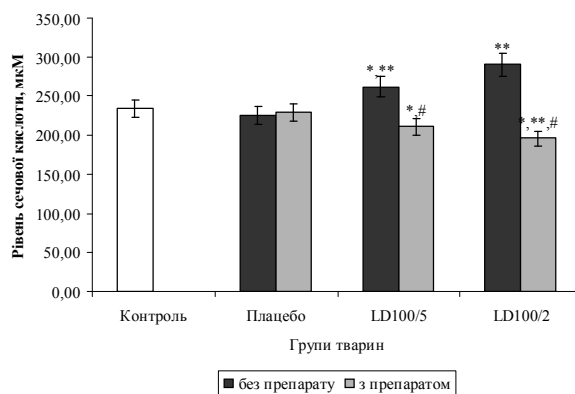


Рис. 2. Вміст сечової кислоти в сироватці крові щурів за умов споживання сочевиці та препарату “Літовіт” на тлі введення ацетату свинцю у дозах $LD_{100}/5$ і $LD_{100}/2$: * – $p < 0,05$ порівняно з контролем; ** – $p < 0,05$ порівняно з плацебо; # – $p < 0,05$ порівняно з відповідною групою без сочевиці та препарату “Літовіт”.

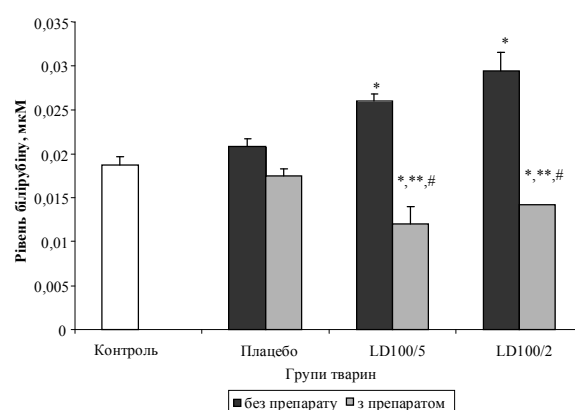


Рис. 3. Вміст білірубину в сироватці крові щурів при дії іонів свинцю і за умов споживання тваринами сочевиці та препарату “Літовіт”: * – $p < 0,05$ порівняно з контролем; ** – $p < 0,05$ порівняно з плацебо; # – $p < 0,05$ порівняно з відповідною групою без сочевиці та препарату “Літовіт”.

бінованого споживання сорбуючих препаратів та антиоксидантів природного походження при отруєннях важкими металами.

ВИСНОВКИ. 1. Встановлено зменшення рівня сечовини в сироватці крові дослідних щурів на $(19 \pm 2) \%$ ($p < 0,05$) та збільшення рівня сечової кислоти в сироватці щурів під впливом ацетату свинцю. У щурів, які додатково споживали сочевицю та препарат "Літовіт", дані показники нормалізувались.

2. Зафіксовано збільшення рівня білірубіну в сироватці крові щурів на 55 та 37 % за

дії іонів свинцю у дозах $LD_{100}/2$ і $LD_{100}/5$ відповідно, а також показано майже дворазове зниження вмісту білірубіну у тварин, які споживали сочевицю та препарат "Літовіт" на тлі інтраперитонеального введення ацетату свинцю, порівняно з тваринами на стандартному раціоні.

3. Отримані результати можуть слугувати основою для рекомендацій щодо використання антиоксидантів та препарату-сорбенту як супроводжувальної терапії при патологічних станах, викликаних отруєнням важкими металами.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Влияние ионов свинца на функциональную активность перитонеальных макрофагов крыс / Л. И. Томачинская, Х. Д. Непийвода, Л. В. Сенчило, А. А. Почтарева // Укр. біохім. журн. – 2010. – **82**, № 4. – С. 147.
2. Забродский П. Ф. Механизмы токсического действия металлов и их влияние на иммунную систему / П. Ф. Забродский // Токсикол. вестник. – 1998. – № 6. – С. 9–15.
3. Измеров Н. Ф. К проблеме оценки воздействия свинца на организм человека / Н. Ф. Измеров // Медицина труда и промышленная экология. – 1998. – № 12. – С. 1–4.
4. Свинец и его действия на организм / А. И. Корбакова, Н. С. Соркина, Н. Н. Молодкина [и др.] //

Медицина труда и промышленная экология. – 2001. – № 5. – С. 29–34.

5. Трахтенберг И. М. Тяжелые металлы как химические загрязнители производственной и окружающей среды / И. М. Трахтенберг // Довкілля та здоров'я. – 1997. – № 2. – С. 48–51.

6. Чечевица (биология, технология, рецепты) / [М. Д. Варлахов, А. И. Алиев, Л. Н. Варлахова и др.]. – Орел, 1994. – 28 с.

7. Guide for the care and use of laboratory animals. – Washington : Nat. acad. press, 1996. – 140 p.

8. Toxicological Profile for Lead. Draft for Public Comment // Comment Period Ends: February 17, 1998. – 483 p.

Т. В. Николаенко, И. В. Бесараб, А. А. Почтарева, Х. Д. Непийвода, Е. В. Лаврова, Ю. А. Ступак, Л. И. Томачинская, Л. В. Гарманчук
КИЕВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ТАРАСА ШЕВЧЕНКО

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ СВИНЦА НА ПОКАЗАТЕЛИ ГЕПАТОБИЛИАРНОЙ СИСТЕМЫ И АЗОТИСТОГО КАТАБОЛИЗМА

Резюме

Зафиксировано снижение уровня мочевины (на $(19 \pm 2) \%$, $p < 0,05$), повышение уровня мочевой кислоты (в среднем на $(15 \pm 3) \%$, $p < 0,05$) и билирубина (в 1,5 раза, $p < 0,05$) в сыворотке крови крыс под влиянием ионов свинца по сравнению с контрольной группой животных. Применение биологической добавки (чечевица и сорбент "Литовит") нормализует вышеуказанные показатели, что свидетельствует о позитивном корригирующем влиянии данной биологической добавки к рациону. Полученные результаты могут быть основанием для рекомендаций о использовании антиоксидантов и препарата-сорбента в качестве сопроводительной терапии при патологических состояниях, вызванных отравлением тяжелыми металлами.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ионы свинца, мочевина, мочевая кислота, билирубин, препарат "Литовит", чечевица.

T. V. Nikolayenko, I. V. Besarab, H. O. Pochtariova, Kh. D. Nepyivoda,
K. V. Lavrova, Yu. A. Stupak, L. I. Tomachynska, L. V. Harmanchuk
TARAS SHEVCHENKO KYIV NATIONAL UNIVERSITY

EFFECT OF LEAD IONS ON INDICATORS OF HEPATOBILIARY SYSTEM AND NITROGEN CATABOLISM

Summary

The study showed, that urea was reduced (by (19±2) %, $p<0,05$), uric acid increased (in average (15±3) %, $p<0,05$) and bilirubin (in the 1,5 times, $p<0,05$) in the serum of rats under the lead ions influence, compared with the control group animals. The usage of biological additives (lentils and sorbent "Litovit") normalizes the parameters listed about that indicates positive corrective influence of the biological additives on the diet. The results can be the basis for recommendations on the use of antioxidant and sorbent as an accompanying therapy under pathological conditions caused by poisoning with heavy metals.

KEY WORDS: lead ions, urea, uric acid, bilirubin, medication "Litovit", lentils.

Отримано 06.04.12

Адреса для листування: Л. В. Гарманчук, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64, Київ, 01601, Україна, e-mail: liudmylagarmanchuk@rambler.ru.

ВІКОВІ ОСОБЛИВОСТІ ВПЛИВУ ПАРАЦЕТАМОЛУ НА ДЕЯКІ ПОКАЗНИКИ ПЕРОКСИДНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ ТА АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ У ЩУРІВ

Досліджено вплив парацетамолу на активність процесів ліпідної пероксидації і показники антиоксидантної системи щурів у різні вікові періоди. Встановлено, що прогресування патологічного процесу в печінці супроводжується інтенсифікацією процесів вільнорадикального окиснення, спричиняє істотне порушення компенсаторних механізмів, особливо стану ферментної та неферментної ланок антиоксидантної системи.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: парацетамол, вікові періоди, пероксидне окиснення ліпідів, антиоксидантна система, щури, печінка.

ВСТУП. Однією з важливих проблем медицини є ураження організму, що виникають у результаті використання медикаментозних препаратів, які при передозуванні пошкоджують організм в цілому, а найбільше – печінку як один з основних органів детоксикації. Лікарським препаратом, що при передозуванні викликає токсичну реакцію, вважають парацетамол (ацетамінофен, N-ацетил-p-амінофенол), який є активним метаболітом фенацетину з хімічно близькими йому властивостями [12, 13]. На сьогодні на фармацевтичному ринку України спостерігається збільшення кількості препаратів (понад 50) парацетамолу як вітчизняного, так і зарубіжного виробництва, які характеризуються різноманітністю лікарських форм – від таблеток, супозиторіїв до фруктових дитячих сиропів, що робить його зручним для застосування людьми всіх вікових груп. Популярність парацетамолу значно зростає, і це пов'язано з поширенням думки, що він є найбільш безпечним з усіх “малих анальгетиків” [1]. У терапевтичних дозах парацетамол має відносно невелику токсичність, проте свідоме, а часто неконтрольоване приймання високих доз препарату може призвести до виникнення ускладнень. За даними медичних центрів США та Великої Британії, передозування парацетамолу є головною причиною гострої печінкової недостатності [12, 14]. Ураження печінки парацетамолом часто набуває форми фульмінантної печінкової недостатності та нерідко завершується смертю хворих [12]. Токсичні ефекти парацетамолу тісно асоційо-

вані з особливостями його біотрансформації, зокрема з утворенням високоактивного інтермедіату N-ацетил-пара-бензохіноніміну, супероксидного радикала [13, 15] та здатністю парацетамолу і його метаболіту N-ацетил-пара-бензохіноніміну стимулювати клітини Купфера, що є продуцентами оксиду азоту, надмірна кількість якого проявляє потужну пошкоджувальну дію.

Гепатотоксична дія парацетамолу значною мірою залежить від віку. Зокрема, новонароджені та молоді щури можуть проявляти як відносну стійкість до некрозогенного впливу препарату внаслідок низької активності цитохрому P-450, так і підвищену чутливість через недостатні ресурси глутатіону [10]. Для дітей та дорослих доза, терапевтичні інтервали і токсичний потенціал парацетамолу також є різними [1]. Тому метою даної роботи було дослідити вплив парацетамолу на процеси пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) і стан антиоксидантної системи (АОС) у щурів різних вікових періодів.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди проведено на 100 статевозрілих щурах-самцях трьох вікових періодів: статевонезрілих (молодих) віком 3 місяці, статевозрілих (дорослих) віком 6–8 місяців і старих віком 18–24 місяці, яких утримували на стандартному раціоні віварію ДВНЗ “Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського”. Тварин було поділено на 2 групи: 1-ша – інтактні тварини; 2-га – тварини з гострим ураженням парацетамолом, який вводили внутрішньовшлун-

© І. М. Кліщ, Х. В. Погорецька, М. І. Куліцька, 2012.

ково в дозі 1250 мг/кг маси ($0,5 LD_{50}$) у вигляді суспензії в 2 % розчині крохмального гелю 1 раз на добу протягом 2 діб. Евтаназію щурів проводили в умовах знеболювання тіопентал-натрієм на 1-шу, 3-тю і 5-ту доби від останнього введення парацетамолу. Всі маніпуляції з експериментальними тваринами проводили, дотримуючись правил відповідно до Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986) [3, 8]. Рівень дієнових кон'югатів (ДК) і вміст ТБК-активних продуктів (ТБК-АП) визначали за загальноприйнятими методиками [4, 9]. Стан антиоксидантної системи оцінювали за активністю супероксиддисмутази (СОД) за методом [11] у модифікації [6] і каталази (КТ) у крові [3] й печінці [7].

Отриманий у результаті експериментів цифровий матеріал обробляли за допомогою методів варіаційної статистики з використанням t-критерію Стюдента [5]. Різницю між досліджуваними групами вважали достовірною при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Про інтенсивність процесів ПОЛ судили за вмістом ДК і ТБК-АП у сироватці крові та гомогенаті печінки. Результати досліджень, наведені в таблиці, показують, що за умов гострого ураження парацетамолом відбуваються значні зміни активності ліпопероксидації. Дія парацетамолу порізно впливала на активність процесів ПОЛ у тварин різних вікових періодів. На 1-шу добу експерименту рівень ДК у печінці статевонезрілих щурів зростав на 47,8 %, у дорослих – на 30,2 %, а у старих – на 62,5 % порівняно з групою інтактних тварин відповідного вікового періоду. В сироватці крові статевонезрілих щурів також спостерігалось достовірне збільшення ДК відносно інтактних тварин (на 22 %), однак воно було менш вираженим, ніж у статевозрілих (110 %) і, особливо, старих (144 %) щурів. Варто відмітити, що у статевозрілих і старих тварин рівень ДК достовірно перевищував аналогічний показник молодих тварин, між старими і статевозрілими щурами суттєвої різниці не було.

Вміст ТБК-АП у печінці тварин всіх вікових періодів також достовірно відрізнявся від такого в інтактних тварин. На 1-шу добу експерименту в статевонезрілих щурів показник зростав на 47,8 %, дорослих і старих – на 14,7 та 62,5 % відповідно відносно контрольних тварин, тоді як у сироватці крові вміст ТБК-АП збільшувався на 93,3; 48,4 та 71,8 % порівняно з аналогічним показником у групі інтактних

тварин. Ми також зафіксували достовірну різницю показників статевонезрілих щурів від дорослих і старих.

Подальше зростання показників ПОЛ спостерігалось на 3-тю добу експерименту. При цьому рівень ДК і ТБК-АП у печінці збільшувався, відповідно, на 86,9 та 201,2 % у статевонезрілих щурів, у дорослих – на 163,9 і 154,3 % та у старих – на 198,8 і 202,8 % порівняно з такими ж показниками у контрольній групі тварин. У сироватці крові вміст ДК і ТБК-АП також був суттєво вищим порівняно з попередньою добою, причому ми відмітили достовірну різницю між віковими періодами, чого не було у печінці.

Аналогічна тенденція спостерігалась і на 5-ту добу досліді. Причому більшість показників мала тенденцію до зростання у тварин усіх вікових періодів, лише концентрація ТБК-АП була дещо нижчою, ніж на 3-тю добу експерименту. Також відмічено достовірну різницю між досліджуваними показниками у сироватці крові молодих і дорослих та старих тварин.

Таким чином, гостре отруєння парацетамолом супроводжувалось суттєвим зростанням показників ліпідної пероксидації у тварин усіх вікових періодів, однак зростання у дорослих і старих тварин було достовірно вищим, ніж у молодих.

Стан антиоксидантного захисту можна розділити на дві лінії. До першої належать ті компоненти АОС, які руйнують активні форми кисню і не дають їм можливості взаємодіяти з поліненасиченими жирними кислотами мембранних фосфоліпідів та білковими молекулами. Серед них найбільше значення мають СОД і КТ. Результати експериментальних досліджень показали, що токсичне ураження щурів парацетамолом супроводжувалось вираженим пригніченням компонентів першої лінії АОС у щурів різних вікових періодів (табл.). Через добу від моменту останнього введення парацетамолу в крові достовірно знижувалась активність СОД – антиоксидантного ензиму, який відіграє ключову роль у захисті клітин при оксидативному стресі. Найбільш вираженого пригнічення зазнавав фермент у крові статевонезрілих та старих щурів, де його активність була в 1,7 і 1,8 раза нижчою за даний показник у групі інтактних тварин, тоді як у дорослих зменшення становило 1,3 раза. Дія парацетамолу призводила до зниження активності СОД і на 3-тю добу дослідження у тварин усіх вікових груп – на 51,5; 27,4 та 48,6 % відповідно у статевонезрілих, дорослих і старих щурів. На 5-ту добу експерименту активність СОД зросла лише у дорослих тварин – на 16,1 % порів-

Таблиця – Динаміка показників вмісту продуктів пероксидного окиснення ліпідів і стану антиоксидантної системи в крові й гомогенаті печінки щурів різного віку з гострим отруєнням парацетамолом ($M \pm m$)

Показник	Біологічна рідина	Група тварин			
		інтактні (n=8)	уражені парацетамолом		
			1-ша доба (n=6)	3-тя доба (n=6)	5-та доба (n=6)
		Статевонезрілі			
ДК, ум. од./мл	Сироватка крові	2,01±0,04	2,45±0,14**	3,01±0,03**	2,89±0,07**
ТБК-АП, мкмоль/л	Сироватка крові	3,14±0,07 [#]	6,07±0,09**	9,28±0,28**	10,57±0,4**
ДК, ум. од./г	Гомогенат печінки	0,69±0,03 [#]	1,02±0,02*	1,29±0,02*	1,44±0,08*
ТБК-АП, мкмоль/кг	Гомогенат печінки	0,86±0,01 [#]	1,13±0,06**	2,59±0,06*	2,33±0,16*
КТ, ммоль/л	Кров	0,119±0,004 [#]	0,087±0,002*	0,057±0,003*	0,051±0,005**
КТ, мкат/кг	Гомогенат печінки	5,41±0,06	3,92±0,11**	2,83±0,09*	3,22±0,12*
СОД, ум. од./мл	Кров	0,339±0,003 [#]	0,193±0,005**	0,164±0,002**	0,151±0,002**
СОД, ум. од./г	Гомогенат печінки	3,27±0,06	3,03±0,09	2,38±0,05*	2,46±0,05*
		Статевозрілі			
ДК, ум. од./мл	Сироватка крові	2,04±0,04	4,29±0,38*	3,99±0,15*	4,59±0,49*
ТБК-АП, мкмоль/л	Сироватка крові	4,75±0,14	7,05±0,31*	12,05±0,58*	13,54±0,68*
ДК, ум. од./г	Гомогенат печінки	0,86±0,03	1,12±0,06*	2,27±0,02*	2,64±0,03*
ТБК-АП, мкмоль/кг	Гомогенат печінки	1,16±0,07	1,51±0,05*	2,95±0,34*	2,34±0,09*
КТ, ммоль/л	Кров	0,153±0,011	0,103±0,005*	0,069±0,004*	0,075±0,007*
КТ, мкат/кг	Гомогенат печінки	5,79±0,23	4,68±0,24*	3,1±0,18*	3,22±0,27*
СОД, ум. од./мл	Кров	0,623±0,006	0,477±0,005*	0,445±0,005*	0,517±0,007*
СОД, ум. од./г	Гомогенат печінки	3,88±0,20	3,36±0,16	2,82±0,14*	2,97±0,24*
		Старі			
ДК, ум. од./мл	Сироватка крові	1,89±0,05 [#]	4,62±0,15*	4,48±0,11**	4,71±0,11*
ТБК-АП, мкмоль/л	Сироватка крові	4,43±0,15	7,61±0,09*	12,72±0,31*	13,64±0,29*
ДК, ум. од./г	Гомогенат печінки	0,80±0,02	1,30±0,04*	2,39±0,04*	2,69±0,02*
ТБК-АП, мкмоль/кг	Гомогенат печінки	1,08±0,04	1,75±0,04*	3,27±0,07*	3,04±0,06*
КТ, ммоль/л	Кров	0,123±0,002	0,069±0,001**	0,046±0,002**	0,043±0,002**
КТ, мкат/кг	Гомогенат печінки	5,51±0,10	3,15±0,09**	2,22±0,04**	2,25±0,05 [#]
СОД, ум. од./мл	Кров	0,578±0,007 [#]	0,351±0,008**	0,297±0,011**	0,292±0,021**
СОД, ум. од./г	Гомогенат печінки	3,62±0,20	3,05±0,04*	2,08±0,06**	2,13±0,03**

Примітка. * – різниця достовірна відносно інтактних тварин відповідної вікової групи; # – різниця достовірна відносно статевозрілих тварин у відповідні терміни дослідження.

няно з попередньою добою, тоді як у двох інших групах вона продовжувала зменшуватись, причому показники були достовірно нижчими від таких у дорослих щурів.

У печінці статевонезрілих і дорослих тварин на 1-шу добу досліду зміни були меншими – на 10,7 та 11,5 % відповідно відносно інтактних, тоді як у старих щурів активність СОД знизилась на 18,6 %. На 3-тю добу експерименту у тварин всіх вікових періодів вона продовжувала знижуватись порівняно з 1-ю добою. До закінчення експерименту (на 5-ту добу) було відмічено зростання активності СОД у печінці тварин усіх груп порівняно з попереднім терміном експерименту. Варто відмітити, що, якщо у статевонезрілих тварин не спостерігалось достовірного зниження ензимної активності в печінці, то у старих вона була достовірно меншою у всі терміни дослідження, а в дорослих – на 3-тю і 5-ту доби.

Відомо, що у процесі дисмутації супероксидного аніон-радикала утворюється пероксид водню, що відновлюється до H_2O пе-

реважно каталазою та глутатіонпероксидазою, причому в захисті клітин від оксидативного стресу, що спричиняє H_2O_2 в таких концентраціях, провідну роль відіграє каталаза [3]. Як показали результати проведеного нами дослідження, при ураженні щурів парацетамолом активність КТ у крові значно знижувалась. Через добу від моменту введення парацетамолу в молодих тварин активність КТ була меншою, порівняно з інтактними, на 36,8 %, а у дорослих і старих – на 48,5 та 78,3 % відповідно. На 3-тю добу експерименту активність ензиму достовірно знижувалась у сироватці крові тварин всіх вікових періодів, однак максимальне зниження зафіксовано у старих щурів – на 94,6 %. До 5-ї доби дослідження у статевонезрілих та старих тварин активність КТ продовжувала зменшуватись, а в дорослих даний показник почав зростати.

Під впливом парацетамолу активність КТ у печінці також значно пригнічувалась. На 1-шу добу експерименту відмічено достовірне зниження активності ферменту в печінці тварин

всіх вікових періодів, однак і тут виявлено вікові особливості. Якщо у статевонезрілих щурів показник був меншим, ніж в інтактних, на 38,1 %, то у старих – на 74,9 %, а в дорослих – на 23,7 %. Через 3 доби від останнього введення парацетамолу ми спостерігали подальше зниження активності КТ у печінці щурів усіх вікових періодів, причому найінтенсивніше – у старих тварин, в яких вона становила 40,4 % від норми для даної вікової групи. На 5-ту добу експерименту активність КТ у гомогенаті печінки молодих і дорослих тварин почала незначно зростати, а старих – залишалась на рівні 3-ї доби. За абсолютними показниками каталазна активність печінки у статевозрілих тварин достовірно відрізнялась від відповідного показника в старих і статевонезрілих.

Таким чином, під впливом парацетамолу ферменти першої лінії антиоксидантного захисту в крові й печінці зазнавали суттєвого пригнічення, однак у старих тварин воно було значно суттєвішим, ніж у молодих і дорослих.

ВИСНОВКИ. 1. Гостре отруєння парацетамолом спричиняє виражену інтенсифікацію процесів ліпопероксидації у крові й печінці щурів різних вікових періодів, про що свідчить зростання концентрації ДК і ТБК-АП, а також пригнічення першої лінії антиоксидантного захисту, що проявляється зниженням активності СОД та КТ.

2. Існують вікові особливості впливу парацетамолу на активність ліпоперекиснення ліпідів і стан АОС. Найбільш виражені зміни спостерігаються у статевонезрілих і старих тварин, причиною чого може бути нижчий вихідний рівень компонентів антиоксидантного захисту.

Перспективи подальших досліджень. Дослідження вікових особливостей порушень процесів ліпідної пероксидації і стану антиоксидантної системи дозволить вдосконалити ранню діагностику отруєнь парацетамолом, а також стане підґрунтям для розробки адекватних методів їх профілактики та корекції.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Викторов А. П. Этот "новый-старый парацетамол" / А. П. Викторов // Современные проблемы токсикологии. – 1998. – № 2. – С. 87–91.
2. Доклінічні дослідження лікарських засобів : методичні рекомендації / за ред. О. В. Стефанова. – К. : Авіцена, 2001. – С. 115–128.
3. Дудин В. И. Колориметрическое определение перекиси водорода при измерении активности каталазы в крови / В. И. Дудин // Проблемы биологии продуктивных животных. – 2008. – № 2. – С. 96–99.
4. Колесова О. Е. Пероксидное окисление липидов и методы определения продуктов липопероксидации в биологических средах / О. Е. Колесова, А. А. Маркин, Т. Н. Федорова // Лаб. дело. – 1984. – № 9. – С. 540–546.
5. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. – К. : Морион, 2000. – 320 с.
6. Макаревич О. П. Активность супероксиддисмутазы крови в острый период различных заболеваний / О. П. Макаревич, П. П. Голиков // Лаб. дело. – 1983. – № 6. – С. 24–27.
7. Метод определения активности каталазы / М. А. Корольюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова, В. Е. Токарев // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–18.
8. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / [Кожем'якін Ю. М., Хромов О. С., Філоненко М. А., Сайфетдінова Г. А.]. – К. : Авіцена, 2002. – 156 с.

9. Стальная И. Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / И. Д. Стальная, Т. Г. Гаришвили // Современные методы в биохимии / под ред. В. Н. Ореховича. – М. : Медицина, 1977. – С. 66–68.
10. Трахтенберг І. М. Нариси вікової токсикології / за ред. І. М. Трахтенберга. – К. : Авіцена, 2005. – 256 с.
11. Чевари С. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах / С. Чевари, И. Чаба, Й. Секей // Лаб. дело. – 1985. – № 11. – С. 678–681.
12. Cohen S. D. Acetaminophen induced hepatotoxicity / S. D. Cohen, D. J. Hoivik, E. A. Khairallah // Toxicology of the Liver. – New York: Raven Press, 1998. – P. 159–186.
13. Lieber C. S. Cytochrome P-450E1: its physiological and pathological role / C. S. Lieber // Physiological reviews. – 1997. – **77**, № 2. – P. 518–544.
14. Paracetamol toxicity: epidemiology, prevention and costs to the health-care system / C. L. Sheen, J. F. Dillon, D. N. Bateman [et al.] // Q. J. Med. – 2002. – **95**, № 9. – P. 609–619.
15. Thomsen M. S. Oxidative metabolism of acetaminophen (paracetamol) to a reactive species: Involved cytochrome P-450 enzymes and target toxicity related to covalent binding / M. S. Thomsen // Ugeskr. Laeger. – 1996. – **158**, № 28. – P. 4095–4096.

ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ ПАРАЦЕТАМОЛА НА НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПЕРОКСИДНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ У КРЫС

Резюме

Исследовано влияние парацетамола на активность процессов липидной пероксидации и показатели антиоксидантной системы крыс в различные возрастные периоды. Установлено, что прогрессирование патологического процесса в печени сопровождается интенсификацией процессов свободнорадикального окисления, вызывает существенное нарушение компенсаторных механизмов, особенно состояния ферментного и неферментного звеньев антиоксидантной системы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: парацетамол, возрастные периоды, пероксидное окисление липидов, антиоксидантная система, крысы, печень.

I. M. Klishch, H. V. Pohoretska, M. I. Kulitska
I. YA. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

THE AGE PECULIARITIES OF PARACETAMOL INFLUENCE ON LIPID PEROXIDATION AND ANTIOXIDANT SYSTEM PARAMETERS IN WHITE RATS

Summary

The influence of paracetamol on lipid peroxidation activity processes and antioxidant system parameters in white rats of different age were investigated. Also there was found out that the progression of the pathological process in the liver is accompanied by intensification of free radical oxidation, which causes a deviation of compensatory mechanisms, especially the state of fermental and nonfermental links of the antioxidant system.

KEY WORDS: paracetamol, age periods, lipid peroxidation, antioxidant system, rats, liver.

Отримано 10.08.12

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

МЕТАБОЛІЧНІ ПОРУШЕННЯ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТІ 2 ТИПУ ТА ПРИЗНАЧЕННІ ВОДОРОЗЧИННОЇ ФОРМИ КВЕРЦЕТИНУ

Встановлено, що при цукровому діабеті 2 типу (утримування щурів на високожировій дієті, одноразове введення стрептозотоцину, 30 мг/кг) відбувається зростання у крові рівнів глюкози, загального холестерину, тригліцеридів, активності аланін- і аспартатамінотрансферази, лужної фосфатази, вмісту білірубину, в печінці – активація пероксидного окиснення ліпідів, дискоординація активності ферментів мітохондрій. Водорозчинна форма кверцетину (10 мг/кг, протягом 2 тижнів) сприяє зниженню рівня глюкози в крові, позитивним змінам показників ліпідного обміну та зменшенню ознак ураження печінки при цукровому діабеті 2 типу.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: цукровий діабет 2 типу, метаболічні порушення, печінка, кверцетин.

ВСТУП. Цукровий діабет (ЦД) є найбільш поширеним ендокринним захворюванням на планеті, що має тенденцію до безперервного зростання. Згідно зі статистикою, кожні 10–15 років кількість хворих на цю патологію подвоюється, причому частка хворих на ЦД 2 типу становить 85–90 % від їх загальної кількості [2, 12]. Серед тяжких ускладнень даного захворювання важливе місце посідає неалкогольний стеатогепатит (НАСГ), для якого характерні запальна інфільтрація печінки на тлі жирової дистрофії гепатоцитів та фіброз, які можуть сприяти розвитку стеатогенного цирозу печінки [13]. Встановлено також, що у 75 % хворих на ЦД 2 типу є та чи інша стадія НАСГ [11]. При цьому суттєво поглиблюються метаболічні зміни, характерні для ЦД [9]. Виходячи з вищезазначеного, актуальним залишається питання щодо встановлення метаболічних порушень при цукровому діабеті 2 типу, зокрема біохімічних ознак і молекулярних механізмів ураження печінки, та пошуку ефективних способів їх корекції.

Метою даної роботи було встановити біохімічні зміни при експериментальному цукровому діабеті 2 типу та вплив водорозчинної форми кверцетину на порушення, які виникають.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проводили на нелінійних білих щурах-самцях масою 200–250 г. Піддослідних тварин поділили на три групи: 1-ша – контроль (інтактні тварини); 2-га – тварини з ЦД; тваринам

3-ї групи з ЦД вводили водорозчинну форму кверцетину (корвітин, Борщагівський хім.-фарм. завод, м. Київ; у дозі 10 мг/кг маси тіла, внутрішньочеревно, щоденно, починаючи через 10 тижнів після введення STZ, протягом 2 тижнів) [8, 10]. Моделювання ЦД 2 типу здійснювали шляхом одноразового внутрішньочеревного введення стрептозотоцину (STZ, Sigma, США, 30 мг/кг маси тіла) [14] після попереднього чотиритижневого утримування щурів на високожировій дієті [14]. STZ безпосередньо перед введенням розчиняли в 0,1 молярному цитратному буфері (рН 4,5); контрольній групі тварин вводили відповідну кількість цитратного буфера. В експерименті використовували щурів з рівнем глюкози не нижче 10,8 ммоль/л через 2 тижні після введення STZ. Контрольну групу тварин утримували на стандартній дієті. При роботі зі щурами дотримувались принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей. Досліджували сироватку крові та тканину печінки. Визначали: у сироватці крові – рівень глюкози, активність лужної фосфатази (ЛФ), аланінамінонотрансферази (АлАТ), аспартатамінотрансферази (АсАТ), загального білірубину, загального холестерину (ЗХС), тригліцеридів (ТГ) (за стандартними наборами ООО НПП “Филисит диагностика”, Україна); у гомогенатах тканини печінки – вміст ТБК-активних продуктів (ТБК-АП) [1], активність каталази (КАТ) [7], сукцинатдегідрогенази (СДГ) [5] та цитохромоксидази (ЦХО) [6].

Статистичну обробку результатів досліджень проводили, використовуючи t-критерій Стюдента, за допомогою програми "Excell". Зміни вважали достовірними при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. У ході досліджень ми встановили, що концентрація глюкози в крові тварин з експериментальним ЦД 2 типу зростала на 233,5 % проти відповідного показника у контрольній групі, що є одним з достовірних критеріїв адекватного моделювання патології. Біохімічні показники функцій печінки є головними критеріями, які дають змогу оцінити її стан і з'ясувати характер ураження. У наших досліджах виявлено зростання АлАТ на 33,3 %, АсАТ – на 7,1 %, ЛФ – на 81,9 %, загального білірубину – на 45,3 % порівняно з контрольною групою щурів (табл.). Отримані зміни свідчать про наявність в експериментальних тварин з ЦД симптомів гепатопатії, що характеризується цитолітичними та холестатичними процесами.

У тварин з ЦД, які отримували кверцетин, рівень глюкози був нижчим на 47,1 %, ніж у щурів, яким не проводили корекцію (табл.). Одночасно спостерігались ознаки поліпшення стану печінки. Зокрема, знижувались активність АлАТ – на 15,3 % (при незмінному рівні АсАТ), ЛФ – на 28,6 %, вміст загального білірубину – на 27,5 %. Ймовірно, отримані зміни зумовлені потужною антиоксидантною та мембраностабілізуювальною властивостями кверцетину [4].

При аналізі показників ліпідного обміну встановлено, що за умов розвитку ЦД 2 типу відбувалося зростання в крові рівня загального холестерину – на 104 % та тригліцеридів – на 155 %. Такі зміни також підтверджують розвиток експериментального ЦД

2 типу, для якого характерні гіперхолестеринемія та гіпертригліцеридемія [3]. На фоні введення водорозчинної форми кверцетину спостерігалось зниження рівнів загального холестерину і тригліцеридів – на 40,4 та 51,7 % відповідно порівняно з групою тварин із ЦД (табл.).

Про посилення пероксидного окиснення ліпідів у печінці при ЦД 2 типу свідчило зростання рівня ТБК-активних продуктів у гомогенатах органа на 129,0 %. При цьому відмічали компенсаторне збільшення активності каталази у печінці на 19,2 %. У групі щурів, яким вводили кверцетин, спостерігали зниження вмісту ТБК-активних продуктів на 41 %, активності каталази – на 11 %. У тварин із ЦД зареєстровано порушення функціонування електронно-транспортного ланцюга мітохондрій у печінці, про що свідчило підвищення активності СДГ на 25,4 % з одночасним зменшенням активності ЦХО на 17,4 %. На фоні введення кверцетину рівень СДГ знижувався на 16,0 %, рівень ЦХО, навпаки, збільшувався на 12,3 % порівняно з групою щурів із діабетом, які не отримували корекції (табл.).

Таким чином, при експериментальному цукровому діабеті 2 типу водорозчинна форма кверцетину сприяє зниженню рівня глюкози в крові, позитивним змінам показників ліпідного обміну та зменшенню ознак ураження печінки.

ВИСНОВКИ. 1. При експериментальному цукровому діабеті 2 типу відбувається зростання в крові рівнів глюкози, загального холестерину, тригліцеридів, що супроводжується біохімічними змінами, які свідчать про ураження печінки: підвищенням активності АлАТ, АсАТ, лужної фосфатази, вмісту білірубину – в

Таблиця – Біохімічні показники сироватки крові та печінки при експериментальному цукровому діабеті 2 типу і застосуванні водорозчинної форми кверцетину ($M \pm m$)

Показник	Група тварин		
	контроль	STZ-діабет	STZ-діабет+ кверцетин
Глюкоза, ммоль/л	4,9 $\pm$ 0,38	16,34 $\pm$ 1,4*	8,65 $\pm$ 0,62**/*
АлАТ, мккат/л	1,71 $\pm$ 0,08	2,28 $\pm$ 0,04*	1,93 $\pm$ 0,07**
АсАТ, мккат/л	1,97 $\pm$ 0,20	2,11 $\pm$ 0,16	2,06 $\pm$ 0,19**
ЛФ, ммоль/(л год)	1,27 $\pm$ 0,21	2,31 $\pm$ 0,11*	1,65 $\pm$ 0,13**
Загальний білірубін, мкмоль/л	2,25 $\pm$ 0,19	3,27 $\pm$ 0,13*	2,37 $\pm$ 0,15**
Загальний холестерин, ммоль/л	2,22 $\pm$ 0,17	4,53 $\pm$ 0,27*	2,70 $\pm$ 0,13**/*
Тригліцериди, ммоль/л	1,29 $\pm$ 0,13	3,29 $\pm$ 0,16*	1,59 $\pm$ 0,13**
ТБК-АП, мкмоль/кг	1,30 $\pm$ 0,14	2,98 $\pm$ 0,17*	1,75 $\pm$ 0,82**
Каталаза, кат/кг	8,40 $\pm$ 0,30	10,01 $\pm$ 0,27*	8,91 $\pm$ 0,16**
СДГ, ммоль/(кг хв)	5,86 $\pm$ 0,34	7,35 $\pm$ 0,16*	6,18 $\pm$ 0,19**
ЦХО, ммоль/(кг хв)	8,20 $\pm$ 0,26	6,77 $\pm$ 0,16*	7,60 $\pm$ 0,15**

Примітка. Різниця достовірна: * – відносно контролю, ** – відносно STZ-діабету.

сироватці крові, збільшенням рівня ТБК-активних продуктів, активності каталази, дискоординацією активності ферментів мітохондрій – у гомогенатах печінки.

2. Водорозчинна форма кверцетину у тварин з діабетом 2 типу сприяє зниженню в

крові рівнів глюкози, загального холестерину, тригліцеридів, загального білірубину, активності АлАТ, лужної фосфатази, у печінці – зменшенню порушень у системах прооксиданти/антиоксиданти та мітохондріального транспорту електронів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Андреева Л. И. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой / Л. И. Андреева, Л. А. Кожемякин, А. А. Кишкун // Лаб. дело. – 1988. – № 11. – С. 41–43.

2. Бабичева О. О. Дисбаланс показників біоелементного обміну і взаємозв'язок з перебігом неалкогольної жирової хвороби печінки у хворих на цукровий діабет 2 типу / О. О. Бабичева // Медицина сьогодні і завтра. – 2010. – № 4 (49). – С. 77–80.

3. Відтворення експериментальної стрептозоточин-індукованої моделі цукрового діабету 2 типу у щурів / Т. І. Геленова, В. В. Конопельнюк, О. М. Савчук [та ін.] // Фізика живого. – 2010. – **18**, № 3. – С. 50–54.

4. Деримедвідь Л. В. Можливості застосування комбінацій природних антиоксидантів за умов первинної інсулінорезистентності / Л. В. Деримедвідь, І. П. Бухтіярова // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2011. – № 2 (21). – С. 37–42.

5. Ещенко Н. Д. Определение количества янтарной кислоты и активности сукцинатдегидрогеназы / Н. Д. Ещенко, Г. Г. Вольский // Методы биохимических исследований. – Л. : Изд-во Ленинградского университета, 1982. – С. 207–210.

6. Кривченкова Р. С. Определение активности цитохромоксидазы в суспензии митохондрий / Р. С. Кривченкова // Современные методы в биохимии / под ред. В. Н. Ореховича. – М. : Медицина, 1977. – С. 47–49.

7. Метод определения активности каталазы / М. А. Корольюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова [и др.] // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.

8. Торгалло Є. О. Особливості процесів вільнорадикального окиснення ліпідів за умов експери-

ментального геморагічного інсульту, а також вивчення дії антиоксидантних препаратів / Є. О. Торгалло, Я. Б. Раєцька // Фізика живого. – 2009. – **17**, №1. – С. 155–158.

9. Харченко В. В. Структурно-функціональний стан еритроцита і корекція порушень при неалкогольній жировій хворобі печінки в поєднанні із гіпертонічною хворобою / В. В. Харченко // Сучасна гастроентерологія. – 2009. – № 2 (46). – С. 29–33.

10. Low dose streptozotocin (STZ) combined with high energy intake can effectively induce type 2 diabetes through altering the related gene expression / Hui Jie Wang, Yuan Xiang Jin PhD, Wan Shen [et al.] // Asia Pac. J. Clin. Nutr. – 2007. – № 16 (Suppl 1). – P. 412–417.

11. Mohili J. Relation between leptin and insulin in patients with type 2 diabetes mellitus [Text] / J. Mohili, D. Gujug // Turkish J. Endocrinology and Metabol. – 2005. – № 2. – P. 55–58.

12. Type-2 Diabetes Mellitus and Malaria Parasitaemia: Effect on Liver Function Tests / E. J. Ikekpeazu, E. E. Neboh, I. C. Maduka [et al.] // Asian Journal of Medical Sciences. – 2010. – № 2 (5). – P. 214–217.

13. Quercetin downregulates NADPH oxidase, increases eNOS activity and prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats [Електронний ресурс] / Sanchez Manuel, Galisteo Milagros, Vera Rocio [et al.] // Journal of Hypertension. – 2006. – № 24 (1). – P. 75–84.

14. Xiu-Hua Shen. Vitamin E regulates adipocytokine expression in a rat model of dietary-induced obesity / Xiu-Hua Shen, Qing-Ya Tang, Juan Huang // Experimental Biology and Medicine. – 2010. – № 235. – P. 47–51.

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2 ТИПА И НАЗНАЧЕНИИ ВОДОРАСТВОРИМОЙ ФОРМЫ КВЕРЦЕТИНА

Резюме

Установлено, что при сахарном диабете 2 типа (содержание крыс на высокожировой диете, однократное введение стрептозотоцина, 30 мг/кг) происходит возрастание в крови уровней глюкозы, общего холестерина, триглицеридов, активности аланин- и аспартатаминотрансферазы, щелочной фосфатазы, содержания билирубина, в печени – активация пероксидного окисления липидов, дискоординация активности ферментов митохондрий. Водорастворимая форма кверцетина (10 мг/кг, в течение 2 недель) способствует снижению уровня глюкозы в крови, положительным изменениям показателей липидного обмена и уменьшению признаков поражения печени при сахарном диабете 2 типа.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: сахарный диабет 2 типа, метаболические нарушения, печень, кверцетин.

K. A. Posokhova, N. B. Zozulyak, V. V. Nikolayeva
I. YA. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

METABOLIC DISORDERS AT EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS OF TYPE 2 AND UNDER THE INFLUENCE OF WATER SOLUBLE FORM OF CUERCETIN

Summary

It was proved that experimental diabetes mellitus of type 2 (high fat diet, single injection of streptozotocine, 30 mg/kg) is accompanied with an increase of glucose, cholesterol, triglycerides, bilirubine level, activity of aminotransferases, alkaline phosphatase in blood, in liver – with activation of lipid peroxidation, discoordination of mitochondrial enzymes activities. Water soluble form of cuercetin (10 mg/kg, during 2 weeks) causes the decrease of glucose level in blood, attenuates lipid metabolism changes and signs of liver damage in diabetes mellitus of type 2.

KEY WORDS: diabetes mellitus of type 2, metabolic changes, liver, cuercetin.

Отримано 20.08.12

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

ОСОБЛИВОСТІ ФУНКЦІОНУВАННЯ ТРОМБОЦИТІВ ЗА УМОВ РОЗВИТКУ СИСТЕМНОГО ЧЕРВОНОГО ВОВЧАКА

Показано, що за системного червоного вовчака у хворих змінюється чутливість тромбоцитів до АДФ та колагену, зростають активність та концентрація PAI-1 у плазмі крові. Встановлено, що загальна фракція імуноглобулінів класу G, виділених із сироватки крові хворих на системний червоний вовчак, викликає підвищену секрецію PAI-1 з тромбоцитів щурів та зміну якісного і кількісного складу інгібітора.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: тромбоцити, системний червоний вовчак, інгібітор активаторів плазміногена 1 типу.

ВСТУП. Системний червоний вовчак (СЧВ) являє собою хронічну запальну хворобу, яка має численні прояви та перебігає з постійними рецидивами. Вона характеризується автоімунною відповіддю на власні ядерні та цитоплазматичні антигени. Системний червоний вовчак впливає на всі органи та системи організму, але перш за все порушується функціонування нирок, нервової системи та системи гемостазу [2, 4, 12]. Існує тісний взаємозв'язок між тромбоутворенням та запаленням – запалення призводить до активації коагуляції, що, у свою чергу, сприяє розвитку запальних процесів [7, 9]. Патологічне тромбоутворення є вагомим ускладненням за цієї патології, і ризик тромбозу у хворих значно вищий, ніж у загальній популяції [10, 11]. Тромбоцити відіграють ключову роль у тромбогенезі та є основним джерелом інгібітора активаторів плазміногена 1 типу (PAI-1). Висока концентрація PAI-1 інгібує фібриноліз та сприяє подальшому розвитку тромбозу [3, 8]. Тому метою даної роботи було комплексне дослідження стану тромбоцитів за системного червоного вовчака.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Аналіз агрегації тромбоцитів проводили на базі Українського державного НДІ реабілітації інвалідів МОЗ України. Процес агрегації тромбоцитів досліджували на фотооптичному агрегометрі AP2110 “Солар” (Білорусь). Кров для дослідження отримували з ліктьової вени широкою голкою в пластикові пробірки з антикоагулянтом 3,8 % цитратом натрію у співвідношенні 9:1 з 8 до 9 год ранку натщесерце. Багату та бідну на тромбоцити плазму крові для дослі-

дження агрегації тромбоцитів одержували шляхом центрифугування за 160 і 250 g відповідно. Агрегацію тромбоцитів досліджували впродовж перших 2 год після забору крові. Як індуктор агрегації використовували АДФ та колаген. Робочі розведення реактиву готували безпосередньо перед дослідженням згідно з рекомендаціями фірми-виробника. Ступінь агрегації визначали як максимальний рівень світлопропускання плазми крові після внесення індуктора агрегації.

Вміст інгібітора активаторів плазміногена 1 типу в плазмі крові, збагаченій тромбоцитами (ПЗТ), та середовищі інкубації тромбоцитів визначали методом імуноферментного аналізу за стандартною методикою [6]. Активність інгібітора визначали за модифікованим методом [5].

Якісний та кількісний склад секреторних форм інгібітора вивчали методом вестерн-блотингу згідно з протоколом [13].

Обробку даних здійснювали за допомогою програм “TotalLab 2.01” (Amersham Biosciences) та “Statistica 6.0” (SPSS Inc.).

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Для дослідження агрегації тромбоцитів використовували як індуктори агрегації АДФ та колаген. За розвитку СЧВ чутливість тромбоцитів до обох індукторів була підвищеною – на 20 та 10 % відповідно (табл. 1). Спонтанної агрегації у хворих не спостерігалось.

Аналіз вмісту та активності PAI-1 у плазмі крові хворих (n=250) показав значне підвищення активності та вмісту інгібітора порівняно з контрольною групою (n=65). Активність PAI-1 становила ($83,1 \pm 11,3$) ME t-PA/мл, тоді як контрольний показник складав ($12,6 \pm 2,4$) ME t-PA/мл. Вміст PAI-1 становив ($49,7 \pm 3,8$) та

Таблиця 1 – Ступінь агрегації тромбоцитів у здорових осіб та хворих на СЧВ

Група	Ступінь агрегації
АДФ 2,5 мкМ	
Контроль (n=30)	51,4±1,3
Хворі на СЧВ (n=40)	62,3±2,4*
Колаген 2 мг/мл	
Контроль (n=30)	78,5±1,2
Хворі на СЧВ (n=40)	87,8±1,1*

Примітка. Тут і в наступній таблиці: * – достовірні зміни порівняно з контролем ($p < 0,05$).

(8,7±0,5) нг/мл у двох групах відповідно [1]. Таким чином, активність та пул інгібітора за СЧВ перевищували норму майже у 6 разів.

Для проведення подальших досліджень використовували модельну систему *in vitro*. Для цього отримували плазму крові, збагачену тромбоцитами, та чисті тромбоцити щурів. Із сироватки крові хворих на СЧВ хроматографічно виділяли загальну фракцію антитіл класу G (IgG СЧВ) та вивчали вплив IgG СЧВ на показники функціонування тромбоцитів (табл. 2). Як додаткове контрольне значення визначали вміст PAI-1 у бідній на тромбоцити плазмі щурів, де показник складав (18,2±1,4) нг/мл. У контрольний зразок ПЗТ додавали 50 мМ трис-НСІ буфер, рН 7,4, з вмістом 130 мМ NaCl, який використовували для розведення IgG СЧВ. Зразки інкубували при 37 °С протягом 30 хв. За умов контролю концентрація PAI-1 у збагаченій тромбоцитами плазмі становила (41,2±5,6) нг/мл. При внесенні до зразка (IgG СЧВ) у кількості 1 мг/мл вміст інгібітора зростає до (91,3±11,2) нг/мл.

У контрольному середовищі інкубації тромбоцитів PAI-1 не було виявлено. Однак при внесенні до тромбоцитів антитіл класу G, виділених із сироватки хворих на СЧВ (IgG СЧВ), у кількості 0,5 та 1 мг/мл вміст PAI-1 становив (39,8±6,1) і (64,8±10,2) нг/мл відповідно.

Дослідження якісного та кількісного складу PAI-1 проводили методом вестерн-блотингу з використанням поліклональних антитіл до інгібітора. При аналізі блотограми у контрольному зразку було виявлено 3 комплексні форми інгібітора з молекулярними масами в межах 250, 200, 135 кДа (рис.). Спостерігалось незначне виділення вільної форми PAI-1 (смуга з молекулярною масою 56 кДа) та фрагмента інгібітора з молекулярною масою близько 30 кДа.

Таблиця 2 – Вміст інгібітора активаторів плазміногена у ПЗТ та середовищі інкубації тромбоцитів щурів

Об'єкт дослідження	Без IgG СЧВ, нг/мл	При додаванні 0,5 мг/мл IgG СЧВ, нг/мл	При додаванні 1 мг/мл IgG СЧВ, нг/мл
ПЗТ	41,2±5,6	59±8,7	91,3±11,2*
Тромбоцити	0	39,8±6,1*	64,8±10,2*
Плазма крові	18,2±1,4		

При внесенні до зразка IgG СЧВ у кількості 0,5 мг/мл чітко виявлялися 3 комплексні форми інгібітора з молекулярними масами в межах 340, 300 та 130 кДа. Значно посилювалося розщеплення інгібітора – на блотограмі чітко видно 4 його фрагменти.

При збільшенні концентрації IgG СЧВ до 1 мг/мл спостерігалася поява ще 2-х комплексних форм PAI-1 з молекулярними масами в межах 200 та 100 кДа. При цьому зменшувався вміст вільної форми PAI-1, ймовірно, за рахунок комплексоутворення.

Внаслідок впливу IgG СЧВ основна маса інгібітора секретується у вільній формі, на яку припадає близько 40 % загального пулу, та в комплексній формі з молекулярною масою 130 кДа, на яку також припадає близько 40 % загального пулу PAI-1. Близько 10 % PAI-1 розщеплюється.

ВИСНОВКИ. Показано, що у групі хворих на СЧВ чутливість тромбоцитів до АДФ та колагену підвищена на 20 та 10 % відповідно. Спонтанної агрегації у хворих не спостерігається. Вміст PAI-1, а отже, і ступінь активації тромбоцитів прямо пропорційно залежить від концентрації антитіл класу G, наявних у крові хворих на СЧВ. Антитіла у концентрації 1 мг/мл спричиняють зростання вмісту PAI-1 у ПЗТ більше ніж у 2 рази. Інгібітор вивільнюється з тромбоцитів у різних комплексних формах, при цьому значно зростає його фрагментація.



Рис. Блотограма середовища інкубації тромбоцитів щурів з IgG СЧВ: 1 – маркери молекулярної маси, кДа; 2 – середовище інкубації тромбоцитів; 3 – середовище інкубації тромбоцитів з IgG СЧВ у кількості 0,5 мг/мл; 4 – середовище інкубації тромбоцитів з IgG СЧВ у кількості 1 мг/мл.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Характеристика фибринолитического потенциала плазмы крови при системной красной волчанке / М. С. Дармостук, А. Н. Савчук, Н. К. Бурлова-Васильева [и др.] // Лаб. діагностика. – 2010. – **52**, № 2. – С. 15–19.
2. Aringer M. Systemic lupus erythematosus / M. Aringer, F. Hiepe // Rheumatol. – 2011. – **70**, № 4. – P. 313–323.
3. Distribution of plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in tissues / A. Simpson, N. Booth, N. Moore, B. Bennett // J. Clin. Pathol. – 1991. – **44**. – P. 139–143.
4. Doruk Erkan. Lupus and thrombosis / E. Doruk // J. Rheumatol. – 2006. – **33**. – P. 1715–1717.
5. Eriksson E. Determination of plasminogen activator inhibitor in plasma using t-PA and a chromogenic single-point poly-D-lysine stimulated assay / E. Eriksson, M. Ranby, E. Gyzander // Thromb. Res. – 1988. – **50**. – P. 91–101.
6. Harlow E. Antibodies / E. Harlow, D. Lane. – New York : Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. – 726 p.
7. Kleinert S. Systemic lupus erythematosus. A problem based approach / S. Kleinert, M. Feuchtenberger, H. P. Tony // Internist (Berl). – 2010. – **51**, № 8. – P. 1013–1026.
8. Korte E. A. Contributions of mass spectrometry-based proteomics to defining cellular mechanisms and diagnostic markers for systemic lupus erythematosus / E. A. Korte, P. M. Gaffney, D. W. Powell // Arthritis Res Ther. – 2012. – **14**, № 1. – P. 204.
9. Levi M. Bidirectional relation between inflammation and coagulation / M. Levi, T. Poll, H. R. Buller // Circulation. – 2004. – **109**. – P. 2698–2704.
10. Lupus anticoagulant: An analysis of the clinical and laboratory features of 219 cases / D. A. Gastineau, F. J. Kazmier, W. L. Nichols, W. Bowie // Am. J. Hematol. – 1985. – **19**, № 3. – P. 265–275.
11. Lupus anticoagulants are stronger risk factors or thrombosis than anticardiolipin antibodies in the antiphospholipid syndrome: a systematic review of the literature / M. Galli, D. Luciani, G. Bertolini and T. Barbui // Blood. – 2003. – **101**. – P. 1827–1832.
12. Platelets retain high levels of active plasminogen activator inhibitor 1 / H. Brogren, K. Wallmark, J. Deinum [et al.] // PLoS One. – 2011. – **6**, № 11. – P. 1–7.
13. Selected methods for antibody and nucleic acid probes. – USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993. – 680 p.

Т. Б. Вовк, Н. К. Бурлова-Васильева, Л. И. Остапченко
КИЕВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ТАРАСА ШЕВЧЕНКО

ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ТРОМБОЦИТОВ ПРИ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКЕ

Резюме

Показано, что при системной красной волчанке изменяется чувствительность тромбоцитов к АДФ и колагену, возрастают активность и концентрация PAI-1 в плазме крови. Установлено, что общая фракция иммуноглобулинов класса G, выделенных из сыворотки крови больных системной красной волчанкой, вызывает повышенную секрецию PAI-1 из тромбоцитов крыс и изменение качественного и количественного состава ингибитора.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: тромбоциты, системная красная волчанка, ингибитор активаторов плазминогена 1 типа.

T. B. Vovk, N. K. Burlova-Vasylieva, L. I. Ostapchenko
KYIV TARAS SHEVCHENKO NATIONAL UNIVERSITY

ASPECTS OF PLATELET BEHAVIOR UNDER SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS

Summary

Alterations of cell sensitivity to ADP and collagen and elevation of PAI-1 activity and content were detected in patients with systemic lupus erythematosus. It was shown that IgG purified from blood plasma of patients with systemic lupus erythematosus caused the elevation of PAI-1 secretion from platelets and alterations of qualitative and quantitative composition of the inhibitor.

KEY WORDS: platelets, systemic lupus erythematosus, type 1 plasminogen activator inhibitor.

Отримано 23.04.12

Адреса для листування: Т. Б. Вовк, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64, Київ, 01601, Україна, e-mail: burlova@mail.ru.

ЗАСТОСУВАННЯ ІНГІБІТОРА ІНДУЦИБЕЛЬНОЇ СИНТАЗИ ОКСИДУ АЗОТУ N-(3-(АМІНОМЕТИЛ)БЕНЗИЛ)АЦЕТАМІДИНУ ПРИ ЛІПОПОЛІСАХАРИДНОМУ ЗАПАЛЕННІ ТКАНИН ПАРОДОНТА

Метою роботи було дослідити вплив селективного інгібітора iNOS N-(3-(амінометил)бензил)ацетамідину (1400W) на перебіг ліпополісахаридного (ЛПС) запалення тканин пародонта. Дослідження проведено на білих щурах, у яких моделювали пародонтит шляхом введення в тканини ясен бактеріального ЛПС. Паралельне з ЛПС застосування 1400W суттєво попереджувало підвищення в крові й пародонті вмісту нітритів і нітратів, ТБК-активних продуктів, окисномодифікованих білків, запобігало зниженню активності супероксиддисмутази і зменшенню вмісту відновленого глутатіону. Зроблено висновок, що в патогенезі пародонтиту, викликаного ендотоксинами грамнегативної мікрофлори, важлива роль належить гіперактивації індукцибельної NO-синтази.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: пародонтит, ліпополісахарид, оксидативний та нітрооксидативний стреси, N-(3-(амінометил)бензил)ацетамідин.

ВСТУП. Однією з найважливіших проблем сучасної стоматології є запальні захворювання тканин пародонта [16]. Основну пародонтопатогенну роль відіграють анаеробні грамнегативні мікроорганізми. Механізми, що лежать в основі впливу токсинів грамнегативної флори на патогенез пародонтиту, можливості корекції порушень метаболізму за такої патології на сьогодні все ще потребують детальнішого вивчення. Відомо, що при пародонтиті у тканинах ясен спостерігається підвищений вміст високоактивної індукцибельної синтази оксиду азоту (iNOS) [9, 14, 15]. Експресія iNOS при пародонтиті відбувається під впливом бактеріальних ліпополісахаридів, ендотоксинів, цитокінів та інших факторів. Надмірне утворення NO, що має місце при стимуляції iNOS ендотоксинами мікрофлори, призводить до надмірного утворення пероксинітриту і, як наслідок, до нітрооксидативного стресу. Як відомо, у патогенезі генералізованого пародонтиту беруть участь порушення процесів ліпопероксидації в ясенних тканинах, що тісно пов'язано з продукуванням NO і цитокіновим профілем. Встановлено також, що при пародонтиті відбуваються виражені зміни системи антиоксидного захисту в біологічних рідинах ротової порожнини і тканинах ясен [4, 7, 8]. Виходячи з розуміння важливості NO у механізмах запалення пародонта, повинна будуватися стратегія корекції

метаболічних порушень, що виникають при пародонтиті. В цьому відношенні варті уваги дослідження можливості використання при даній патології селективних інгібіторів індукцибельної форми синтази оксиду азоту.

Метою даної роботи було дослідити в експерименті захисну роль високоселективного інгібітора iNOS N-(3-(амінометил)бензил)ацетамідину (1400W) у перебізі пародонтиту, викликаного ендотоксином грамнегативної мікрофлори.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди виконано на 30 безпородних щурах-самцях масою 150–180 г, яких утримували на стандартній дієті. Всіх тварин поділили на 3 групи: 1-ша – контроль (інтактні щури); 2-га – щури, в яких викликали запалення пародонта (протягом 2-х тижнів через день вводили в тканини ясен по 40 мікролітрів (1 мг/мл) ліпополісахариду E. Coli (ЛПС)); 3-тя – щури, яким паралельно з ЛПС протягом 2-х тижнів через день вводили внутрішньочеревно 1400W у дозі 1,5 мг/кг [3]. Тварин виводили з експерименту шляхом декапітації під ефірним наркозом. У гомогенаті тканин пародонта та в крові визначали рівень нітратів і нітритів (NO_x) [11], ТБК-активних продуктів (ТБК-АП) [1], окисномодифікованих білків (ОМБ) [6], активність супероксиддисмутази (СОД) [10], каталази (КТ) [5] та вміст відновленого глутатіону (GSH) [13]. В плазмі крові

© В. В. Щерба, М. М. Корда, 2012.

також визначали вміст церулоплазміну (ЦП) [2] і загальну антиоксидантну активність (ЗАА) [12].

Результати виражали як середнє±SEM з 10 експериментів. Зміни $p < 0,05$ розглядали як статистично достовірні. Статистичний аналіз виконували, використовуючи стандартні статистичні програми і t-критерій Стюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Як видно з результатів, наведених у таблиці, нітрооксидативний і оксидативний стреси є тими фундаментальними механізмами, що відіграють важливу роль у патогенезі запалення ясен, викликаного токсинами грамнегативної мікрофлори. Про це свідчить достовірне зростання вмісту в плазмі крові й пародонті щурів, яким вводили ЛПС, нітритів і нітратів, ТБК-АП та ОМБ, а також зниження активності СОД і рівня GSH у тканинах ясен.

Паралельне з ЛПС введення тваринам 1400W протягом 2-х тижнів практично нормалізувало показники концентрації NO_x в тканинах. Так, у плазмі крові вміст нітритів і нітратів після застосування високоселективного інгібітора iNOS знизився, порівняно з нелікованими щурами, на 25 %, а в пародонті – на 31 %. Це ще раз підтверджує, що під впливом ЛПС відбувається гіперекспресія саме індукцйбельної форми NO-синтази в тканинах ясен, у результаті чого синтезується надмірна кількість оксиду азоту. Оскільки NO є радикалом, його посилене продукування призводить до активації вільнорадикальних реакцій у тканинах та роз-

витку запального процесу. З іншого боку, відомо, що при захворюваннях інфекційного генезу NO також може відігравати позитивну роль, оскільки здатний виступати неспецифічним фактором захисту від бактерій. Зокрема, посилене продукування NO макрофагами стимулює реакції фагоцитозу, що сприяє елімінації інфекційного збудника з тканин. Разом із тим, дефіцит NO призводить до хронізації патологічного процесу.

Очевидно, саме попередженням вироблення надмірної кількості NO у тканинах ясен щурів з пародонтитом за допомогою 1400W і, як наслідок, пригніченням запальних реакцій можна пояснити отримані нами дані, що свідчать про достовірне зниження інтенсивності процесів ліпопероксидації в досліджуваних тканинах. Так, вміст ТБК-активних продуктів у плазмі крові щурів, які піддавалися корекції, зменшувався на 23 % ($p < 0,05$), а в пародонті – на 20 % ($p < 0,05$).

Застосування інгібітора iNOS позитивно позначилося також на параметрах, що відображають ступінь окисної модифікації нейтральних і лужних амінокислот. У тканинах пародонта щурів, яким проводили корекцію, вміст 2,4-динітрофенілгідразонів, що визначалися при 310 нм (відображає концентрацію альдегідів і кетонітрофенілгідразонів нейтрального характеру), і таких, що визначалися при 430 нм (альдегідів і кетонітрофенілгідразонів основного характеру), зменшився в 1,3 раза порівняно з некоригованими тваринами. У плазмі крові дані показники під-

Таблиця – Вплив N-(3-(амінометил)бензил)ацетамідину на показники інтенсивності оксидативного і нітрооксидативного стресів у плазмі крові й тканині пародонта щурів з ліпополісахаридним пародонтитом

Показник	Група тварин		
	контроль	ЛПС	ЛПС+1400W
Плазма крові			
NO_x , ммоль/л	2,75±0,15	3,85±0,18*	2,92±0,22 [#]
ТБК-АП, мкмоль/л	42,60±3,04	58,60±3,40*	45,35±3,20 [#]
ОМБ ₃₁₀ , мкмоль/мг білка	0,94±0,07	1,28±0,08*	1,15±0,10
ОМБ ₄₃₀ , мкмоль/мг білка	0,50±0,02	0,85±0,06*	0,62±0,05
КТ, мкат/л	0,44±0,03	0,55±0,04	0,52±0,04
ЦП, г/л	0,26±0,01	0,22±0,02	0,23±0,02
GSH, ммоль/л	3,20±0,18	2,70±0,20	2,95±0,25
ЗАА, % гальмування утворення ТБК-АП	58,30±4,10	47,34±3,12	50,98±6,20
Тканини пародонта			
NO_x , ммоль/кг	0,96±0,05	1,64±0,12*	1,14±0,10 [#]
ТБК-АП, мкмоль/кг	2,75±0,20	3,95±0,22*	3,15±0,16 [#]
ОМБ ₃₁₀ , мкмоль/мг білка	3,62±0,25	5,95±0,40*	4,55±0,25 [#]
ОМБ ₄₃₀ , мкмоль/мг білка	2,65±0,22	5,36±0,40*	4,05±0,20 [#]
СОД, од.	0,26±0,02	0,15±0,01*	0,22±0,02 [#]
КТ, мкат/мг білка	1,25±0,10	1,05±0,09	1,15±0,02
GSH, ммоль/кг	184,4±10,40	118,5±7,20*	150,6±6,80 [#]

Примітка. * – зміни достовірні порівняно з контролем; [#] – зміни достовірні порівняно з показниками тварин з пародонтитом.

впливом 1400W показали лише тенденцію до зниження, проте зміни виявилися недовірними.

Як відомо, активність процесів ліпопероксидації та окисної модифікації білків залежить не тільки від інтенсивності утворення вільних радикалів, але і від функціонального стану антиоксидантної системи. У разі тривалої посиленої генерації вільних радикалів може настати виснаження захисних антиоксидантних систем, що, у свою чергу, призведе до інтенсифікації вільнорадикальних реакцій ще більшою мірою. Очевидно, запобігання під впливом 1400W надмірному продукуванню NO індукційною

NO-синтазою і, як наслідок, зменшення інтенсивності вільнорадикальних процесів у пародонті щурів, яким вводили ЛПС, були причиною отриманих нами результатів, що свідчать про позитивний ефект інгібітора iNOS на активність СОД і вміст GSH у тканинах ясен.

ВИСНОВОК. У патогенезі пародонтиту, викликаного ендотоксинами грамнегативної мікрофлори, важлива роль належить гіперактивності індукційної NO-синтази. Високоселективний інгібітор iNOS N-(3-(амінометил)бензил)ацетамідин позитивно впливає на перебіг ліпополісахаридного пародонтиту.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Андреева Л. И. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой / Л. И. Андреева, Л. А. Кожемякин, А. А. Кишкун // Лаб. дело. – 1988. – № 11. – С. 41–43.
2. Колб В. Г. Справочник по клинической химии / В. Г. Колб, В. С. Камышников. – Минск : Беларусь, 1982. – 311 с.
3. Корда М. М. Вплив інгібітора індукційної синтази оксиду азоту N-(3-(Амінометил)бензил)ацетамідину на гепатотоксичність алілового спирту / М. М. Корда, Т. Я. Ярошенко // Мед. хім. – 2004. – 6, № 3. – С. 114–116.
4. Косенко К. Н. Показатели свободнорадикального окисления липидов и антиоксидантной защиты в ротовой жидкости больных генерализованным пародонтитом разных возрастных групп / К. Н. Косенко, Б. Б. Седлецкая, Т. П. Терешина // Вісн. стоматол. – 2004. – № 4. – С. 27–30.
5. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова, В. Е. Токарев // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.
6. Мещишен І. Ф. Метод визначення окислювальної модифікації білків плазми (сироватки) крові / І. Ф. Мещишен // Буковин. мед. вісн. – 1998. – 2, № 1. – С. 156–158.
7. Мороз К. А. Стан пероксидної оксидзації ліпідів і системи антиоксидантного захисту у хворих на генералізований пародонтит в умовах цукрового виробництва // Експерим. клін. фізіол. біох. – 2004. – № 3. – С. 87–90.
8. Пожарицкая М. М. Показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты в смешанной слюне у летчиков сверхзвуковой авиации при пародонтите / М. М. Пожарицкая, Т. П. Ваилова, Т. Г. Симакова // Рос. стоматол. журн. – 2005. – № 2. – С. 39–45.
9. Чайковська І. В. Роль порушень метаболізму оксиду азоту в патогенезі генералізованого пародонтиту / І. В. Чайковська // Арх. клін. експерим. мед. – 2008. – 17, № 2. – С. 226–228.
10. Чевари С. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологическом материале / С. Чевари, И. Чаба, Й. Секей // Лаб. дело. – 1985. – № 11. – С. 678–681.
11. A spectrophotometric method for the direct detection and quantitation of nitric oxide, nitrite, and nitrate in cell culture media / L. Ridnour, J. E. Sim, M. Hayward [et al.] // Anal. Biochem. – 2000. – 281. – P. 223–229.
12. Assay using brain homogenate for measuring the antioxidant activity of biological fluids / J. Stock, J. M. Gutteridge, R. J. Sharp, I. L. Dormandy // Clin. Sci. and Mol. Med. – 1974. – 47. – P. 215–222.
13. Ellman G. L. Tissue sulfhydryl groups / G. L. Ellman // Arch. of Bioch. and Biophys. – 1959. – 82. – P. 70–77.
14. Gingival endothelial and inducible nitric oxide synthase levels during orthodontic treatment: a cross-sectional study / M. D'Attilio, F. Di Maio, C. D'Arcangela [et al.] // Angle. Orthod. – 2004. – 74, № 6. – P. 851–858.
15. Lipid A-associated proteins from Porphyromonas gingivalis stimulate release of nitric oxide by inducing expression of inducible nitric oxide synthase / E. Y. Choi, Y. M. Hwang, J. Y. Lee [et al.] // J. Periodontal. Res. – 2007. – 42, № 4. – P. 350–360.
16. Noack B. Metabolic diseases and periodontitis / B. Noack, S. Fischer // Dtsch. Med. Wochenschr. – 2012. – 137, № 22. – P. 1155–1157.

ПРИМЕНЕНИЕ ИНГИБИТОРА ИНДУЦИБЕЛЬНОЙ СИНТАЗЫ ОКСИДА АЗОТА N-(3-(АМИНОМЕТИЛ)БЕНЗИЛ)АЦЕТАМИДИНА ПРИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДНОМ ВОСПАЛЕНИИ ТКАНЕЙ ПАРОДОНТА

Резюме

Целью работы было исследовать влияние селективного ингибитора iNOS N-(3-(аминометил)бензил)ацетамидина (1400W) на течение липополисахаридного (ЛПС) воспаления тканей пародонта. Исследование проведено на белых крысах, у которых моделировали пародонтит путем введения в ткани десен бактериального ЛПС. Параллельное с ЛПС применение 1400W существенно предупреждало повышение в крови и пародонте содержания нитритов и нитратов, ТБК-активных продуктов, окислительно-модифицированных белков, предотвращало снижение активности супероксиддисмутазы и уменьшение содержания восстановленного глутатиона. Сделан вывод, что в патогенезе пародонтита, вызванного эндотоксинами грамотрицательной микрофлоры, важная роль принадлежит гиперактивации индуцибельной NO-синтазы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: пародонтит, липополисахарид, оксидативный и нитрооксидативный стрессы, N-(3-(аминометил)бензил)ацетамидин.

V. V. Shcherba, M. M. Korda
I. YA. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

APPLICATION OF INOS INHIBITOR N-(3-(AMINOMETHYL)BENZYL)ACETAMIDINE AT LIPOPOLYSACCHARIDE INFLAMMATION OF PARODONTIUM TISSUE

Summary

The aim of the study was to investigate the effect of a selective iNOS inhibitor N-(3-(aminomethyl)benzyl)acetamide (1400W) on the lipopolysaccharide (LPS) inflammation of parodontium tissues. Parodontitis was modeled by the injection of bacterial LPS into gum tissue of white rats for 2 weeks. Concurrent with LPS application of 1400W significantly prevented the increase of nitrites and nitrates, TBA-active products, oxidative modified proteins, as well as prevented the decrease of SOD activity and reduced glutathione content in blood plasma and parodontium tissue. It was concluded that hyperactivation of inducible NO synthase plays an important role in the parodontitis pathogenesis caused by endotoxins of gram-negative microflora.

KEY WORDS: parodontitis, lipopolysaccharide, oxidative and nitrooxidative stress, N-(3-(aminomethyl)benzyl)acetamide.

Отримано 16.07.12

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

СТАН ЕНДОГЕННОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ У ТВАРИН РІЗНОГО ВІКУ З ГІПО- І ГІПЕРЕРГІЧНИМ ПАРОДОНТИТОМ

Розвиток як гіпо-, так і гіперергічного пародонтиту не викликав підвищення вмісту в сироватці крові маркерів ендогенної інтоксикації – середньомолекулярних пептидів та збільшення сорбційної здатності еритроцитів, що свідчило про високу адаптаційну спроможність організму в дитячому і передпубертатному віці.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: ендогенна інтоксикація, гіпоергічний, гіперергічний перебіг запальної реакції, тканини пародонта.

ВСТУП. Поняття ендогенної інтоксикації (ЕІ) широко використовують як один із критеріїв оцінки стану організму [2]. Окрім того, відомо, що характер імунної відповіді за розвитку патології певною мірою залежить від вмісту в крові середньомолекулярних пептидів (СМП), які проявляють мембранодеструктивну дію [6]. Особливо важливим цей критерій стає за умов нагромадження кінцевих продуктів метаболізму білків, ліпідів та інших речовин, тобто при посиленні катаболічних процесів, що має місце при гострій та хронічній патології. Автори вивчали маркери ЕІ у ротовій рідині в осіб з інтактним пародонтом [7]. Розвиток запально-дистрофічних уражень пародонта за зміненої реактивності організму дорослих експериментальних тварин призводив до імунних порушень з розвитком ЕІ [1].

Тому з'ясування ступеня ЕІ у тварин при розвитку запалення в пародонті за зміненої реактивності, можливо, дасть новий поступ у розумінні механізмів ураження пародонта. Зважаючи на це, становило інтерес дослідити особливості змін показників ЕІ у тварин різного віку з гіпо- і гіперергічним пародонтитом. Це й стало метою даної роботи.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди проведено на 60 білих різностатевих нелінійних щурах масою 100–1500 г, віком 1 (30 шт.) і 2 місяці (30 шт.), яких поділили на три групи: 1-ша група – 10 білих щурів із гіпоергічною реакцією; 2-га – 10 білих щурів із гіперергічною реакцією; контрольна – 10 білих щурів, яким

внутрішньом'язово вводили 0,5 мл фізіологічного розчину. Моделювання гіпоергічної реакції проводили шляхом внутрішньом'язового введення алкілюючого цитостатика – циклофосфану (БАТ "Київмедпрепарат", Україна) протягом 7 днів щоденно з розрахунку 10 мг/кг маси тіла [4]. Гіперергічну реакцію моделювали шляхом внутрішньом'язового введення імуностимулятора полісахаридної природи – пірогеналу (НДІЕМ ім. М. Ф. Гамалєї РАМН, Росія) протягом 7 днів щоденно з розрахунку на одну тварину 10 мкг/кг на фізіологічному розчині [5].

У групах спостережень виникали виражені зміни з боку тканин пародонта, які характеризувалися набряком, кровоточивістю, ерозивним ясен, зменшенням висоти ясенного сосочка, руйнуванням кругової зв'язки, оголенням кореня зуба. Забір крові проводили через 7 діб після початку експерименту. Ступінь вираження ендогенного токсичного синдрому оцінювали за вмістом у сироватці крові СМП, тяжкість ЕІ визначали за величиною СЗЕ згідно з рекомендаціями проф. М. А. Андрейчина і співавт. (1998) [3]. Кількісні показники обробляли методом варіаційної статистики.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Детоксикаційна спроможність організму одномісячних щурів за розвитку гіпо- і гіперергічного пародонтиту змінювалася. Так, вміст СМП (ланцюгові та ароматичні амінокислоти у середньомолекулярних пептидах і продукти їх розпаду) зменшився на 14,29 % (у 1,2 раза) та 42,86 % (у 1,8 раза, $p < 0,05$) у тварин з гіпо- і гіперергічним пародонтитом відповідно (табл. 1).

СЗЕ зменшилася на 4,39 % у тварин з гіпоергічним пародонтитом та на 49,23 % (у 1,97 раза, $p < 0,05$) – з гіперергічним.

Тобто в одномісячних щурів (що відповідає віку людини 4–7 років) за рівнем СМП не відбувалося підвищення ендогенної інтоксикації. Зменшення СЗЕ свідчило про недосконалість цієї елімінаційної системи організму в одномісячних тварин.

У двомісячних щурів коливання показників ендогенної інтоксикації також були. Розвиток гіпоергічного пародонтиту сприяв зменшенню

рівня СМП на 42,11 % (у 1,7 раза), гіперергічного – на 31,58 % (у 1,5 раза). СЗЕ зменшилася незначно: при гіпоергічному пародонтиті – на 9,35 %, при гіперергічному – на 2,55 % (табл. 2).

Таким чином, у двомісячних щурів (що відповідає віку людини 8–12 років) можна стверджувати, що за рівнем СМП ендогенна інтоксикація не розвивалася; зменшення СЗЕ свідчило про пригнічення цієї елімінаційної системи організму в двомісячних тварин.

Таблиця 1 – Вміст СМП та СЗЕ в крові одномісячних щурів різних груп ($n=10$, $M \pm m$)

№ з/п	Показник	Дослідна група тварин		
		інтактний контроль	гіпоергічний пародонтит	гіперергічний пародонтит
1	СМП, ум. од.	$0,42 \pm 0,08$	$0,36 \pm 0,02$	$0,24 \pm 0,06^*$
2	СЗЕ, %	$30,53 \pm 1,35$	$29,19 \pm 1,03^{**}$	$15,5 \pm 4,07^{**}$

Примітка. Тут і в наступній таблиці: * – відхилення показника достовірне відносно контрольної групи тварин, $p < 0,05$; ** – відхилення показника достовірне між дослідними групами тварин, $p < 0,05$.

Таблиця 2 – Вміст СМП та СЗЕ в крові двомісячних щурів різних груп ($n=10$, $M \pm m$)

№ з/п	Показник	Дослідна група тварин		
		інтактний контроль	гіпоергічний пародонтит	гіперергічний пародонтит
1	СМП, ум. од.	$0,38 \pm 0,06$	$0,22 \pm 0,04$	$0,26 \pm 0,04$
2	СЗЕ, %	$33,37 \pm 4,42$	$30,25 \pm 1,35$	$32,52 \pm 0,37$

ВИСНОВКИ. 1. У сироватці крові щурів усіх груп спостереження всіх вікових підгруп вміст СМП (ланцюгові та ароматичні амінокислоти у середньомолекулярних пептидах і продукти їх розпаду) зменшився. Імовірно, зменшення СМП у дослідних групах можна пояснити фізіологічними особливостями функціонування організму в цьому віці (друге подвоєння маси (1 міс.) і третє подвоєння маси (2 міс.)), коли онтогенетично переважають анаболічні процеси навіть за наявності запального процесу.

2. Порівняння величин СЗЕ між віковими підгрупами показало, що в молодих щурів (віком 1 і 2 місяці) даний показник зменшувався, тобто ця елімінаційна спроможність організму не спрацьовувала, була недосконалою, особливо в одномісячних щурів з гіпоергічним пародонтитом.

3. Як показали наші попередні дослідження [1], лише в дорослих щурів зростала СЗЕ, що свідчило про адекватну реакцію організму на наявність запального процесу в пародонті та розпад білка.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Авдєєв О. В. Стан ендогенної інтоксикації у тварин із запаленням у пародонті за зміненої реактивності / О. В. Авдєєв // Мед. хімія. – 2011. – **13**, № 1. – С. 126–129.
2. Бакалюк О. Й. Синдром ендогенної інтоксикації, механізм виникнення, методи ідентифікації / О. Й. Бакалюк, Н. Я. Панчишин, С. В. Дзиг'я // Вісник наук. досліджень. – 2000. – № 1. – С. 11–13.
3. Методи дослідження ендогенної інтоксикації організму : методичні рекомендації / [М. А. Андрейчин, М. Д. Бех, В. В. Дем'яненко та ін.]. – Київ, 1998. – 31 с.
4. Пат. 57189 Україна, МПК (2011.01) А61К 31/00 G09B 23/28 (2006.01). Спосіб моделювання

пародонтиту / Авдєєв О. В.; Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського. – № u201010071 ; заявл. 16.08.10 ; опубл. 10.02.11, Бюл. № 3, 2011 р.

5. Пат. 66298 Україна, МПК А61К 39/104 (2006.01); G09B 23/28 (2006.01). Спосіб моделювання пародонтиту / Авдєєв О. В.; Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського. – № u201108090 ; заявл. 29.06.11 ; опубл. 26.12.11, Бюл. № 24, 2011 р.

6. Швед М. І. Застосування вобензиму для корекції порушень перекисного окислення ліпідів і синдрому ендогенної інтоксикації при аутоімунних ускладненнях гострого інфаркту міокарда / М. І. Швед,

І. П. Тофан, Л. В. Радецька [та ін.] // Вісник наук. досліджень. – 2006. – № 4. – С. 107–110.

7. Яворская Л. В. Изучение маркеров эндогенной интоксикации в ротовой жидкости у лиц, резис-

тентных к пародонтальной патологии / Л. В. Яворская, И. В. Чайковская // Вісник стоматології (спец-випуск). – 2012. – № 6 (79). – С. 133–134.

А. В. Авдеев

ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

СОСТОЯНИЕ ЭНДОГЕННОЙ ИНТОКСИКАЦИИ У ЖИВОТНЫХ РАЗЛИЧНОГО ВОЗРАСТА С ГИПО- И ГИПЕРЭРГИЧЕСКИМ ПАРОДОНТИТОМ

Резюме

Развитие как гипо-, так и гиперэргического пародонтита не вызывало повышения содержания в сыворотке крови маркеров эндогенной интоксикации – среднемолекулярных пептидов и увеличения сорбционной способности эритроцитов, что свидетельствовало о высокой адаптационной возможности организма в детском и предпубертатном возрасте.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **эндогенная интоксикация, гипозэргическое, гиперэргическое течение воспалительной реакции, ткани пародонта.**

O. V. Avdieiev

I. YA. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

STATE OF ENDOGENOUS INTOXICATION FOR ANIMALS OF DIFFERENT AGE WITH HYPO- AND HYPERERGIC PARODONTITIS

Summary

Development of both hypo- and hyperergic parodontitis did not cause the increase of maintenance in the blood serum of markers of endogenous intoxication – middle molecules peptides and increase of adsorption possibility of erythrocytes, that testified to high adaptation possibility of organism in child's and before pubescence age.

KEY WORDS: **endogenous intoxication, hypoergic, hyperergic ran across inflammatory reaction, tissues of parodontitis.**

Отримано 02.07.12

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

ОДЕРЖАННЯ І СТАНДАРТИЗАЦІЯ ЕКСТРАКТІВ СТАРОДУБА ШИРОКОЛИСТОГО

Отримано екстракти листків та коренів стародуба широколистого і стандартизовано відповідно до вимог ДФУ, вивчено їх фармакологічну активність. Встановлено кількісний вміст дубильних і фенольних сполук у сухих екстрактах коренів і листків.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: види роду Стародуб, біологічно активні речовини, фенольні сполуки, рослинна сировина.

ВСТУП. Перспективним напрямком пошуку нових лікарських препаратів є дослідження субстанцій рослинного походження та створення на їх основі конкурентоспроможних та безпечних лікарських засобів.

Стародуб широколистий досить широко використовують у науковій і народній медицині. Біологічна дія стародуба широколистого зумовлена широким спектром біологічно активних речовин та полягає в тому, що його застосовують для лікування захворювань гепатобіліарної системи, серед яких особливе місце займають хвороби підшлункової залози [4, 6].

Метою роботи були одержання і стандартизація екстрактів листків та коренів стародуба широколистого (*Laserpitium latifolium* L.) родини зонтичних (Apiaceae).

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Вихідною сировиною для одержання сухих екстрактів були подрібнені листки і корені стародуба широколистого, заготовлені у 2004 році в околицях с. Спаське Сторожинецького району Чернівецької області під час масової вегетації і відмирання надземної частини відповідно. Корені подрібнювали до розміру частинок 2–5 мм, листки – до розміру частинок 1–2,5 мм [5]. Для одержання водних екстрактів сировину стародуба широколистого екстрагували водою очищеною, водно-спиртових екстрактів – 70 або 50 % етанолом у колбі зі зворотним холодильником на водяному огрівнику при температурі кипіння екстрагенту протягом 30 хв. Водні й водно-спиртові екстракти висушували ліофільно. Екстракти заморожували в спиртових ван-

нах при температурі спирту не вище –40 °С протягом 30 хв. Температура продукту в кінцевий період висушування не перевищувала +40 °С. Загальна тривалість висушування для одержання екстрактів становила 28–32 год.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Одержані екстракти – це пухкі порошки від світло-жовтого до темно-коричневого кольору, гіркі на смак, з характерним специфічним рослинним запахом. За допомогою реакцій ідентифікації і хроматографії на папері в екстрактах виявлено флавоноїди, дубильні речовини, гідроксикоричні кислоти, кумарини та ін. Характеристику і вихід екстрактів наведено в таблиці 1.

Проведені дослідження (табл. 1) показали, що вихід екстрактів для коренів стародуба широколистого становить 43,03–44,56 %, для листків – 28,42–30,45 % залежно від виду екстрагенту.

Кількісне визначення дубильних речовин в одержаних екстрактах проводили перманганатометричним методом за методикою ГФ СССР XI видання [1]. Для кількісного визначення суми фенольних сполук використовували фотоколориметричний метод на основі реакції з реактивом Фоліна–Чокальте в перерахунок на хлорогенову кислоту [2]. Результати визначення показників якості екстрактів наведено в таблиці 2.

Дослідження вмісту дубильних речовин, суми фенольних сполук в екстрактах коренів та листків стародуба широколистого показало (табл. 2), що їх кількість у водно-спиртових екстрактах в 1,0–1,2 раза більша, ніж у водних. Одержані екстракти досліджували на гостру токсичність, вивчали їх гепатозахисні та про-

Таблиця 1 – Характеристика і вихід екстрактів стародуба широколистого

Сировина	Умове позначення екстракту	Екстрагент	Колір і консистенція	Вихід, %, $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$, n=3
Корені	СК - В	Вода	Світлий пухкий порошок	43,03±0,3
	СК - 5	50 % етанол	Світло-жовтий пухкий порошок	44,56±0,1
Листки	СЛ - В	Вода	Коричневий пухкий порошок	30,45±0,2
	СЛ - 7	70 % етанол	Темно-коричневий пухкий порошок	28,42±0,4

Таблиця 2 – Кількісний вміст БАР в екстрактах стародуба широколистого

Умове позначення екстракту	Втрата в масі при висушуванні	Вміст БАР, %, $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$, n=6	
		дубильні речовини	сума фенольних сполук
СК - В	4,68±0,2	3,57±0,2	9,96±0,5
СК - 5	4,62±0,2	5,31±0,3	12,46±0,6
СЛ - В	4,84±0,2	5,72±0,3	25,33±0,3
СЛ - 7	4,72±0,2	9,88±0,5	29,59±0,5

тизапальні властивості, вплив на перебіг експериментального панкреатиту. В результаті проведених досліджень встановлено, що з усіх досліджуваних екстрактів найбільш виражену гепатозахисну активність проявляв екстракт коренів, виготовлений на 50 % етанолі, який знижував за умов гострого токсичного гепатиту активність ферменту АлАТ в 1,8 раза, АсАТ – у 2 рази; проявив інгібуючу дію на активність ЛФ, достовірно зменшуючи активність даного ферменту в 3 рази. Спосіб одержання екстракту з коренів стародуба широколистого, який проявляє гепатопротекторну активність, захищено патентом на корисну модель № 24528 [3].

Доброякісність сухого екстракту регламентується в розробленому проекті аналітичної

нормативної документації “Стародуба екстракт сухий”. Стандартизацію сухого екстракту коренів стародуба широколистого проводили за вимогами ДФУ, а саме опис, ідентифікація, залишкова кількість органічних розчинників, втрата в масі при висушуванні, загальна зола, важкі метали, мікробіологічна чистота і кількісне визначення діючих речовин.

Показники якості сухого екстракту коренів стародуба широколистого наведено в таблиці 3.

На основі вивчених нами факторів, які впливають на вихід біологічно активних речовин із сировини, розроблено технологію одержання сухого екстракту коренів стародуба широколистого для лікування захворювань печінки та підшлункової залози.

Таблиця 3 – Показники якості сухого екстракту коренів стародуба широколистого

№ з/п	Досліджуваний параметр	Серія 1	Серія 2	Серія 3
1	Опис	Світло-жовтого кольору, гіркий на смак, з характерним специфічним рослинним запахом		
2	Ідентифікація діючих речовин	Реакція позитивна		
3	Втрата в масі при висушуванні*, %	4,6±0,2	4,6±0,2	4,6±0,2
4	Сума фенольних сполук*, %	12,4±0,6	12,5±0,6	12,4±0,6

Примітка. * – середнє значення 6 визначень.

ВИСНОВОК. Розроблено оптимальні умови одержання сухих екстрактів з коренів та листків стародуба широколистого. Вихід одержаних екстрактів становить для коренів 43,03–44,56 %, для листків – 28,42–30,45 % залежно

від виду екстрагенту. Кількісний вміст суми фенольних сполук становить 9,96–12,46 та 25,33–29,59 % відповідно для екстрактів з коренів та листків при використанні різних екстрагентів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Государственная Фармакопея СССР : Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. – 11-е изд., доп. – М. : Медицина, 1989. – 400 с.

2. Грицик А. Р. Дослідження шавлю альпійського флори Карпат / А. Р. Грицик, Л. В. Бензель, Л. Я. Роговська // Фармац. журн. – 1997. – № 1. – С. 106–109.

3. Пат. 24528 Україна, МПК А 61 К 36/49. Спосіб одержання екстракту коренів стародуба широколистого з гепатопротекторною дією / Сікорин.У.Б., Грицик А.Р., Ерстенюк А.М. – № u 200612194 ; заявл. 20.11.06 ; опубл. 10.07.07, Бюл. № 10. – 6 с.

4. Перспективні рослини Карпатського регіону з гепатопротекторними та жовчогінними властивостями / А. Р. Грицик, Н. П. Цвеюк, Н. М. Лейбенко, У. Б. Сікорин // Запороз. мед. журн. – 2004. – 2, № 1. – С. 99–100.

5. Сікорин У. Б. Одержання сухих екстрактів коренів та листків стародуба широколистого / У. Б. Сікорин // Працюємо, творимо, презентуємо : 77 міжвузівська наукова конференція молодих вчених і студентів, 9–11 квітня : тези доп. – Івано-Франківськ, 2008. – С. 170–171.

6. Сікорин У. Б. Перспективи використання стародуба широколистого в медицині / У. Б. Сікорин, А. Р. Грицик // Фітотерапія. Часопис. – 2005. – № 4. – С. 56–58.

У. Б. Сікорин

ИВАНО-ФРАНКОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

ПОЛУЧЕНИЕ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ЭКСТРАКТОВ ГЛАДЫША ШИРОКОЛИСТОГО

Резюме

Получены экстракты листьев и корней гладыша широколистого и стандартизовано согласно требований ГФУ, изучено их фармакологическую активность. Определено количественное содержание дубильных и фенольных соединений в сухих экстрактах корней и листьев.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: виды рода Гладыш, биологически активные вещества, фенольные соединения, растительное сырье.

U. B. Sikoryn

IVANO-FRANKIVSK NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY

RECEIPT AND STANDARTIZATION OF EXTRACTS OF LASERPITUM LATIFOLIUM

Summary

The extracts of leaves and roots of Laserpitium latifolium are obtained and it is standartized according to the requirements of State Farmacopoea of Ukraine, their pharmacological activity is studied. Quantitaty of tannic and phenoic substances is analised in the dry extracts of roots and leaves.

KEY WORDS: species of genus of Laserpitium, biologically active substances, phenol compounds, raw material.

Отримано 09.07.12

Адреса для листування: У. Б. Сікорин, Івано-Франківський національний медичний університет, вул. Галицька, 124, Івано-Франківськ, 76000, Україна.

ВПЛИВ ПОЛІТРАВМИ НА ДИНАМІКУ РАНЬОГО АПОПТОЗУ ТКАНИННИХ ЛІМФОЦИТІВ

В умовах політравми різко збільшується інтенсивність раннього апоптозу тканинних лімфоцитів легень, серця і печінки впродовж 28 діб посттравматичного періоду. Загальною закономірністю є зростання інтенсивності раннього апоптозу протягом 7 діб посттравматичного періоду зі зниженням через 14 діб, наступним повторним, проте меншим, підвищенням через 21 добу і зниженням через 28 діб.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: політравма, ранній апоптоз, лімфоцити, легені, серце, печінка.

ВСТУП. Важливим досягненням останніх років є доведення провідної ролі в патогенезі травматичної хвороби генералізації запальної реакції під впливом прозапальних цитокінів з формуванням синдрому поліорганної недостатності [4]. Окремі автори вважають, що одним із провідних механізмів переходу системної відповіді організму на запалення до поліорганної недостатності є програмована клітинна загибель – апоптоз, який розвивається в органах, що піддаються запальному впливу [8]. Однак дотепер немає переконливих даних щодо ролі апоптозу у формуванні поліорганної недостатності.

Дослідження динаміки прозапальних цитокінів як індукторів апоптозу в постраждалих з тяжкою політравмою показало, що у ранній посттравматичний період спостерігається висока концентрація проапоптичних цитокінів, яка до 7–10 діб знижується з поступовим збільшенням антиапоптичних цитокінів [2]. Разом із тим, вважають, що цитокіни є тільки ранніми сигнальними молекулами, які належать до пускових механізмів подальших патологічних процесів, і інтенсивність їх утворення не завжди відповідає тяжкості перебігу політравми [4], що спонукає до вивчення безпосередніх проявів апоптозу паренхіматозних клітин.

Одними з найчутливіших клітин організму до проапоптичного впливу цитокінів є лімфоцити. Посилення апоптозу лімфоцитів зумовлює згасання інтенсивності запальної реакції та розвиток імуносупресії у посттравматичний період [9]. Враховуючи те, що лімфоцити постійно циркулюють між кров'ю і тканинами, можна припустити, що апоптоз тканинних лімфоцитів відображає сукупність впливу проза-

пальних цитокінів на рівні органа, що дозволяє оцінити й глибину апоптозу паренхіматозних клітин.

Метою даної роботи було з'ясувати інтенсивність раннього апоптозу лімфоцитів, отриманих із тканини легень, серця і печінки в динаміці політравми.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. В експериментах використано 109 нелінійних білих щурів, яких утримували на стандартному раціоні віварію. 20 тварин склали контрольну групу. В дослідних групах було по 8–14 особин.

Політравму моделювали за методикою Д. В. Козак [6] в умовах тіопентало-натрієвого знеболювання ($40 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ маси тіла тварини). Щурів, які залишились живими, виводили з експерименту на 2 години, 1, 3, 7, 14, 21 і 28 доби методом тотального кровопускання із серця в умовах знеболювання. Для виділення лімфоцитів органів промиті у фосфатно-сольовому буфері легені, серце та печінку гомогенізували в подрібнювачі тканин, гомогенат центрифугували 20 хв при 8000 об./хв. З надосадової рідини виділяли фракції лімфоцитів на градієнті щільності фікол-тріумбасту 1,077. Для оцінки реалізації апоптозу лімфоцитів легень, серця та печінки використовували ФІТЦ-мічений анексин V з набору реагентів "ANNEXIN V FITC" ("Beckman Coulter", Франція). Аналіз проб проводили на проточному цитометрі "Epics XL" ("Beckman Coulter", Франція).

Для оцінки достовірності відмінностей використовували t-критерій Стьюдента та критерій Вілкоксона–Манна–Уїтні [5].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Як видно з таблиці, в контрольній групі істотно переважав

Таблиця – Динаміка інтенсивності раннього апоптозу тканинних лімфоцитів легень, серця і печінки у відповідь на політравму ($M \pm m$)

2 год (n=6)	1 доба (n=8)	3 доба (n=5)	7 доба (n=6)	14 доба (n=6)	21 доба (n=6)	28 доба (n=5)
Ранній апоптоз лімфоцитів легень Контроль=(0,53±0,06) мкмоль·л ⁻¹ (n=20)						
2,27±0,24***	4,53±0,32***	8,00±0,29***	47,27±3,59***	6,28±0,23***	20,57±1,05***	7,12±0,67***
Ранній апоптоз лімфоцитів серця Контроль=(0,35±0,02) мкмоль·л ⁻¹ (n=20)						
6,85±0,54***	10,72±0,93***	9,41±0,32***	40,37±1,88***	7,92±0,54***	11,37±0,56***	8,96±0,95***
Ранній апоптоз лімфоцитів печінки Контроль=(0,29±0,04) мкмоль·л ⁻¹ (n=20)						
9,76±1,11***	5,07±0,31***	10,56±0,59***	40,37±3,48***	11,62±0,80***	12,90±0,74***	8,62±0,79***

Примітка. * – достовірність відмінностей стосовно контрольної групи (* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; # – $p < 0,10$).

ранній апоптоз лімфоцитів легень порівняно із серцем і печінкою (відповідно, на 51,4 і 82,8 %, $p < 0,001$).

В умовах політравми різко збільшувалася інтенсивність раннього апоптозу тканинних лімфоцитів досліджуваних органів протягом усього терміну спостереження від 2 год до 28 діб посттравматичного періоду. Загальною закономірністю було зростання інтенсивності раннього апоптозу через 7 діб після політравми зі зниженням через 14 діб, наступним повторним, проте меншим, підвищенням через 21 добу і зниженням через 28 діб.

Звертає на себе увагу той факт, що до трьох діб після політравми інтенсивність раннього апоптозу істотно переважала серед лімфоцитів серця і печінки порівняно з лімфоцитами легень. Через 3 доби після політравми ранній апоптоз лімфоцитів серця і печінки був більшим, відповідно, на 17,6 і 32,0 % ($p < 0,01$).

Через 7 діб після політравми інтенсивність раннього апоптозу ставала максимальною та істотно не відрізнялася серед лімфоцитів досліджуваних органів.

Через 14 діб інтенсивність раннього апоптозу знижувалася, причому серед лімфоцитів легень була статистично достовірно меншою, ніж серед лімфоцитів серця (на 20,7 %, $p < 0,05$) та печінки (на 46,0 %, $p < 0,001$).

Через 21 добу спостерігали повторне підвищення інтенсивності раннього апоптозу, причому серед лімфоцитів легень воно було в 1,81 раза більшим, ніж серед лімфоцитів серця, та в 1,59 раза більшим, ніж серед лімфоцитів печінки ($p < 0,001$).

Через 28 діб ранній апоптоз лімфоцитів досліджуваних органів знижувався, досягав практично однакового рівня, проте у середньому в 21,1 раза перевищував величину контролю ($p < 0,001$).

Враховуючи те, що ранній апоптоз є наслідком впливу на тканини про- і протизапальних цитокінів, можна припустити, що в умовах травми регуляторні механізми тканини

легень більше обмежують інтенсивність раннього апоптозу впродовж перших трьох діб посттравматичного періоду, ніж серця і печінки. На 7 добу настає спалах інтенсивності раннього апоптозу, який не залежить від виду тканини, що вказує на потужний проапоптозний вплив, виснаження механізмів антиапоптозного захисту й розвиток імуносупресії з можливістю виникнення септичних ускладнень. Подальше зниження інтенсивності раннього апоптозу може свідчити про розвиток компенсаторного синдрому антизапальної відповіді, на тлі якого починають переважати протизапальні цитокіни [7].

Наступний спалах раннього апоптозу тканинних лімфоцитів свідчить про фазовість посттравматичного періоду, пов'язаний із завершенням терміну формування імунологічної відповіді на пошкодження, яка супроводжується стимуляцією утворення проапоптозних цитокінів. Подібний феномен загострення через 21 добу показаний на тлі експериментальної кріотравми шкіри [1].

Достатньо високий рівень раннього апоптозу тканинних лімфоцитів на 28 добу вказує на те, що відновлення тканин після політравми ще далеко від свого завершення. Це не може не відобразитися на ступені дистрофічних процесів у тканині легень, серця і печінки в цей термін посттравматичного періоду. Даний факт вказує на подібність принципів формування не тільки шоку в людини і ссавців [3], але й пізнього посттравматичного періоду, що дозволяє експериментальні дані з великою мірою відповідності екстраполювати на людину.

ВИСНОВКИ. 1. В інтактних білих щурів переважає ранній апоптоз лімфоцитів легень порівняно із серцем і печінкою (відповідно, на 51,4 і 82,8 %, $p < 0,001$).

2. В умовах політравми різко збільшується інтенсивність раннього апоптозу тканинних лімфоцитів досліджуваних органів упродовж 28 діб посттравматичного періоду. Загальною

закономірністю є зростання інтенсивності раннього апоптозу через 7 діб після політравми зі зниженням через 14 діб, наступним повторним, проте меншим, підвищенням через 21 добу і зниженням через 28 діб.

Перспективи подальших досліджень.

У перспективі важливим є дослідження апоптозу паренхіматозних клітин ряду органів як єдиного шляху доведення ролі апоптозу в формуванні поліорганної недостатності на тлі політравми.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гудима А. А. Порушення морфофункціонального стану печінки в умовах локальної кріодеструкції шкіри та його корекція / А. А. Гудима, О. Б. Сван, Т. В. Дацко // Здобутки клініч. і експерим. мед. – 2007. – № 2. – С. 183–188.
2. Дзюба Д. А. Показатели активации апоптоза в течении политравмы тяжелой степени / Д. А. Дзюба, И. Р. Малыш, Л. В. Згржебловская // Укр. журн. екстремальной медицины імені Г. О. Можая. – 2008. – 9, № 1. – С. 53–58.
3. Ельський В. Н. Патолофізіологія, діагностика і інтенсивна терапія тяжкої черепно-мозгової травми / В. Н. Ельський, А. М. Кардаш, Г. А. Городник; под ред. В. И. Черниа. – Донецьк: Новий мир, 2004. – 200 с.
4. Калинин О. Г. К патогенезу травматической болезни / О. Г. Калинин, А. О. Калинин // Проблемы військової охорони здоров'я. – 2002. – С. 34–43.
5. Лакин Г. Ф. Биметрия / Г. Ф. Лакин. – М.: Высш. школа, 1990. – 352 с.
6. Пат. 63997 Україна, МПК G 09 B 23/28. Спосіб моделювання політравми / Козак Д. В.; заявник і патентовласник Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського. – № u 201104110; заявл. 05.04.11; опубл. 25.10.11, Бюл. 20.
7. Bone R. C. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS / R. C. Bone // Crit. Care Med. – 1996. – 24. – P. 1125–1128.
8. Fearon D. T. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response / D. T. Fearon, R. M. Locksley // Science. – 1996. – 272. – P. 50–53.
9. Inhibition of Fas/Fas ligand signaling improves septic survival: differential effects on macrophage apoptotic and functional capacity / C. S. Chang, G. Y. Song, J. Lomas [et al.] // J. Leukoc. Biol. – 2003. – 74 (3). – P. 344–351.

Д. В. Козак, А. А. Гудима

ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

ВЛИЯНИЕ ПОЛИТРАВМЫ НА ДИНАМИКУ РАННЕГО АПОПТОЗА ТКАНЕВЫХ ЛИМФОЦИТОВ

Резюме

В условиях политравмы резко увеличивается интенсивность раннего апоптоза тканевых лимфоцитов легких, сердца и печени в течение 28 суток посттравматического периода. Общей закономерностью является рост интенсивности раннего апоптоза в течение 7 суток посттравматического периода со снижением через 14 суток, последующим повторным, однако меньшим, повышением через 21 сутки и снижением через 28 суток.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: политравма, ранний апоптоз, лимфоциты, легкие, сердце, печень.

D. V. Kozak, A. A. Hudyma

I. YA. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

EFFECT OF POLYTRAUMA ON DYNAMICS OF EARLY APOPTOSIS IN TISSUE LYMPHOCYTES

Summary

In case of polytrauma dramatically increases the intensity of early apoptosis in tissue lymphocytes of the lungs, heart and liver during 28 days of post-traumatic period. General pattern is the intensity of early apoptosis within 7 days of post-traumatic period with the reduction in 14 day that is following by smaller repeated increase in 21 days and decrease after 28 days.

KEY WORDS: polytrauma, early apoptosis, lymphocytes, lungs, heart, liver.

Отримано 02.08.12

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

ОСОБЛИВОСТІ СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНИХ ЗМІН В АРТЕРІЯХ ШЛУНОЧКІВ СЕРЦЯ ПРИ ПОСТРЕЗЕКЦІЙНІЙ ЛЕГЕНЕВІЙ ГІПЕРТЕНЗІЇ

Комплексом біохімічних, морфологічних і морфометричних методів встановлено, що правостороння пульмонектомія ускладнюється розвитком легеневого серця і вираженою структурною перебудовою артерій дрібного калібру його шлуночків. Ремодельовання артерій характеризується потовщенням стінки, звуженням просвіту, пошкодженням ендотеліоцитів, істотним зменшенням пропускної здатності цих судин і погіршенням кровопостачання досліджуваного органа. Виявлено сильний негативний кореляційний зв'язок між вмістом нітрит-аніона в шлуночках та відносним об'ємом уражених ендотеліоцитів, що домінувало у правому шлуночку при декомпенсації легеневого серця.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: пострезекційна легенева гіпертензія, артерії, шлуночки серця, нітрит-аніон.

ВСТУП. На даний час патологія серцево-судинної системи є найбільш поширеною, має тенденцію до розповсюдження і часто призводить до інвалідності та смертності населення в молодому працездатному віці [3, 6]. Відомо, що обширні резекції легень, що нерідко зустрічаються в клініці, призводять до пострезекції артеріальної легеневої гіпертензії, яка ускладнюється розвитком легеневого серця та його декомпенсацією.

До сьогодні дискусійними залишаються питання про поширеність гіпертрофії правого шлуночка при хронічних обструктивних захворюваннях легень, а також про роль легеневої гіпертензії в патогенезі легеневого серця [2, 15]. В останні роки дослідники звертають увагу на ремодельовання судин, під яким розуміють зміну їх структури і функції в патологічних умовах як відповідь усіх компонентів стінки (ендотелію, гладких міоцитів, сполучнотканинних елементів) на різні негативні ендо- та екзогенні фактори [5, 7]. Сьогодні в медико-біологічних дослідженнях усе ширше використовують морфометричні методи, які дозволяють отримати кількісні характеристики різних фізіологічних та патологічних процесів і логічно пояснити їх [1], а також звертають увагу на роль ендотеліальної дисфункції в патогенезі різних патологій [3, 13].

Враховуючи наведене, метою даної роботи стало дослідження структурно-функціональних змін артерій шлуночків серця при пострезекційній легеневій гіпертензії.

© Л. В. Татарчук, 2012.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Морфологічними та біохімічними методами вивчено артерії дрібного калібру (зовнішній діаметр – 26–50 мкм) [14] шлуночків серця 60 білих статевозрілих щурів-самців. Їх поділили на 3 групи: до 1-ї групи (контрольної) входили 15 інтактних практично здорових дослідних тварин, які перебували у звичайних умовах віварію; до 2-ї – 33 щури з артеріальною пострезекційною легеневою гіпертензією і компенсованим легеним серцем; до 3-ї – 12 експериментальних тварин з легеневою гіпертензією і декомпенованим легеним серцем. Останнє характеризувалося задишкою, синюшністю слизових оболонок, гідротораксом, гідроперикардом, застійними явищами в органах великого кола кровообігу. Пострезекційну артеріальну легеневу гіпертензію моделювали шляхом виконання у щурів правосторонньої пульмонектомії [4]. Операційні втручання проводили в умовах тіопенталового наркозу з дотриманням правил асептики та антисептики. Через 3 міс. від початку експерименту здійснювали евтаназію дослідних тварин шляхом кровопускання в умовах тіопенталового наркозу. Серце розрізали за методикою Г. Г. Автанділова [1]. Проводили окреме зважування камер серця. З частин серцевого м'яза виготовляли мікропрепарати, які забарвлювали гематоксиліном і еозином, за методами ван-Гізона, Маллорі, Гейденгайна, Вейгерта [11]. Морфометрично у вказаних артеріях шлуночків серця визначали зовнішній (ДЗ) та внутрішній (ДВ) діаметри, товщину медії (ТМ),

індекс Вогенворта – ІВ (відношення площі стінки судини до її просвіту), висоту ендотеліоцитів (ВЕ), діаметр їх ядер (ДЯЕ), ядерно-цитоплазматичні відношення (ЯЦВЕ) в цих клітинах, відносний об'єм пошкоджених ендотеліоцитів (ВОПЕ). В гомогенатах шлуночків досліджували вміст нітрит-аніона, який вважають стабільним метаболітом оксиду азоту. Концентрацію нітрит-аніона в гомогенатах визначали за високоспецифічним електрофотометричним методом Гріна на основі кольорової реакції з реактивом Гріса [9]. Застосовували кореляційний аналіз із визначенням коефіцієнта (r) парної кореляції. Силу зв'язку оцінювали за чотирма ступенями: сильним ($r=0,7-0,9$), значним ($r=0,5-0,7$), помірним ($r=0,3-0,5$), слабким ($r<0,3$). Отримані кількісні величини обробляли статистично. Різницю між порівнювальними морфометричними параметрами визначали за Стьюдентом [8].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Шляхом окремого зважування частин серця дослідних тварин встановлено їх гіпертрофію з домінуванням збільшення маси правого шлуночка. Отримані результати наведено в таблицях 1, 2. Під час аналізу показаних у таблиці 1 даних

встановлено, що правостороння пульмонеотомія призводить до вираженої структурної перебудови артерій дрібного калібру лівого (ЛШ) і правого (ПШ) шлуночків серця. У змодельованих патологічних умовах ДЗ артерій дрібного калібру лівого шлуночка у 2-й групі спостережень статистично достовірно ($p<0,01$) зріс на 8,8 %, а в 3-й – на 14,1 % ($p<0,001$). ТМ досліджуваних судин при цьому виявилася збільшеною, відповідно, на 12,3 і 34,2 %. Суттєво зміненим був також ІВ досліджуваних артерій вказаної камери серця. При цьому даний морфометричний параметр у 2-й групі тварин з високим ступенем достовірності ($p<0,001$) зріс у 1,86, а в 3-й – у 2,9 рази. Висота ендотеліоцитів та діаметр їх ядер артерій дрібного калібру лівого шлуночка при компенсованому легеневого серця змінювалися незначно. ЯЦВЕ в цих клітинах також залишалися стабільними. Морфометрично виражену структурну перебудову встановлено в ендотеліоцитах досліджуваних артерій при декомпенсації легеневого серця. Так, ВЕ при цьому збільшилася на 3,2, ДЯЕ – на 11,3 %. ЯЦВЕ в названих клітинах зросли з $0,250\pm0,003$ до $0,294\pm0,003$, тобто на 17,6 %. Необхідно також вказати, що наведені цифрові величини між

Таблиця 1 – **Морфометрична характеристика артерій дрібного калібру шлуночків серця дослідних тварин ($M\pm m$)**

Показник	Група спостереження		
	1-ша	2-га	3-тя
ДЗЛШ, мкм	$36,20\pm0,51$	$39,40\pm0,54^{**}$	$41,30\pm0,57^{***}$
ДВЛШ, мкм	$23,20\pm0,24$	$18,50\pm0,24^{***}$	$15,50\pm0,21^{***}$
ТМЛШ, мкм	$7,30\pm0,12$	$8,20\pm0,12^{**}$	$9,80\pm0,15^{***}$
ІВЛШ, %	$243,50\pm5,10$	$453,60\pm6,3^{***}$	$709,90\pm10,2^{***}$
ВЕЛШ, мкм	$6,20\pm0,12$	$6,36\pm0,12$	$6,40\pm0,09$
ДЯЕЛШ, мкм	$3,10\pm0,06$	$3,22\pm0,07$	$3,45\pm0,05^*$
ЯЦВЕЛШ	$0,250\pm0,003$	$0,258\pm0,004$	$0,294\pm0,003^{***}$
ВОПЕЛШ, %	$2,10\pm0,03$	$21,50\pm0,30^{***}$	$35,20\pm0,45^{***}$
ДЗПШ, мкм	$36,40\pm0,48$	$40,10\pm0,60^{**}$	$43,20\pm0,9^{***}$
ДВПШ, мкм	$23,30\pm0,24$	$18,20\pm0,30^{***}$	$14,80\pm0,33^{***}$
ТМПШ, мкм	$7,30\pm0,12$	$9,50\pm0,15^{***}$	$13,90\pm0,30^{***}$
ІВПШ, %	$242,10\pm5,10$	$486,40\pm7,5^{***}$	$852,10\pm14,70^{***}$
ВЕПШ, мкм	$6,30\pm0,12$	$6,60\pm0,09^*$	$6,75\pm0,09^*$
ДЯЕПШ, мкм	$3,15\pm0,05$	$3,60\pm0,04^{***}$	$3,76\pm0,05^{***}$
ЯЦВЕПШ	$0,250\pm0,003$	$0,298\pm0,004^{***}$	$0,310\pm0,04^{***}$
ВОПЕПШ, %	$2,05\pm0,02$	$32,80\pm0,51^{***}$	$49,50\pm1,20^{***}$

Примітка. Тут і в наступній таблиці зірочкою позначені величини, що статистично достовірно відрізняються від аналогічних 1-ї групи (* – $p<0,05$; ** – $p<0,01$; *** – $p<0,001$).

Таблиця 2 – **Вміст нітрит-аніона в міокарді лівого та правого шлуночків (ммоль/кг) дослідних тварин ($M\pm m$)**

Частина серця	Група спостереження		
	1-ша	2-га	3-тя
Лівий шлуночок	$4,20\pm0,12$	$2,10\pm0,06^{***}$	$1,20\pm0,03^{***}$
Правий шлуночок	$4,22\pm0,15$	$1,50\pm0,04^{***}$	$0,70\pm0,01^{**}$

собою статистично достовірно відрізнялися ($p < 0,001$).

Артерії дрібного калібру правого шлуночка при змодельованій патології змінилися більшою мірою порівняно з аналогічними судинами лівого шлуночка. При цьому ДЗ вказаних судин у 2-й групі спостережень зріс на 10,1 %, а в 3-й – на 18,7 %, ТМ збільшилась, відповідно, на 30,1 та 90,4 %, а ІВ підвищився у 2,0 і 3,5 рази. Домінуюча структурна перебудова артерій дрібного калібру при пострезекційній артеріальній легеневої гіпертензії пояснюється тим, що їм належить основна роль у регуляції кровопостачання органів. Ці судини більш навантажені у фізіологічних умовах існування організму порівняно з артеріями більшого калібру і при патологічних станах пошкоджуються більшою мірою [10, 14].

Суттєву структурну перебудову ендотеліоцитів артерій дрібного калібру при змодельованій патології виявлено у правому шлуночку у спостереженнях як 2-ї, так і 3-ї груп. Так, ВЕ досліджуваних судин вказаної частини серця при компенсованому легеневого серця статистично достовірно ($p < 0,05$) збільшилась із $(6,30 \pm 0,12)$ до $(6,60 \pm 0,09)$ мкм, тобто на 4,8 %, а при декомпенсації серцевої діяльності – на 7,1 %. Встановлено також зростання діаметрів ядер досліджуваних клітин у даних умовах експерименту. Так, діаметр ядер ендотеліоцитів артерій дрібного калібру правого шлуночка серця у 2-й групі спостережень статистично достовірно ($p < 0,001$) збільшився на 14,3 %, а в 3-й – на 24,0 %. Виражене диспропорційне зростання цитоплазми ендотеліоцитів та їх ядер призводило до істотних змін ЯЦВЕ у досліджуваних клітинах. Так, в ендотеліоцитах вказаних судин у 2-й групі тварин вони статистично достовірно ($p < 0,001$) збільшились на 19,2 %, а в 3-й – на 24 %. Виражені зміни ЯЦВЕ у досліджуваних клітинах свідчили про суттєве порушення клітинного структурного гомеостазу [10, 12]. Істотно зростав при цьому також ВОПЕ у досліджуваних артеріях правого шлуночка. Так, при компенсації серцевої діяльності вказаний морфометричний параметр збільшився у 16 разів, а при декомпенсації – у 24,1 рази.

Під час світлооптичних досліджень мікропрепаратів міокарда експериментальних тварин виявлено виражені судинні розлади, дистрофічні та некробіотичні зміни окремих груп кардіоміоцитів, вогнищеві клітинні інфільтрати, осередки кардіосклерозу, проліферацію ендотеліальних клітин, їх набряк, просякання базальної мембрани плазмовими білками, а також дистрофічно й некробіотично змінені та десквамовані ендотеліоцити. У стінці деяких

артерій дрібного калібру лівого й правого шлуночків серця спостерігалися вогнища фібриноїдного набухання та некрозу, що вказувало на виражене їх пошкодження. Домінували виявлені патоморфологічні зміни у правому шлуночку та при декомпенсації серцевої діяльності. Варто зазначити, що проліферація ендотеліальних клітин у досліджуваних артеріях свідчила про наявність вираженої гіпоксії [10, 14].

У ході досліджень вмісту нітрит-аніона в шлуночках серця при змодельованій патології встановлено, що у 2-й групі спостережень він суттєво змінився. Так, у лівому шлуночку концентрація досліджуваної речовини з високим ступенем достовірності ($p < 0,001$) зменшилась з $(4,20 \pm 0,12)$ до $(2,10 \pm 0,06)$ ммоль/кг, тобто на 50,0 %, а у правому шлуночку – на 64,4 %, при декомпенсації легеневого серця встановлене зниження склало, відповідно, 71,3 та 83,4 %. Під час кореляційного аналізу виявлено сильні негативні кореляційні зв'язки між вмістом нітрит-аніона та відносним об'ємом пошкоджених ендотеліоцитів у лівому ($r = -0,81 \pm 0,03$) і правому ($r = -0,87 \pm 0,04$) шлуночках. З наведеного логічно випливає, що вміст нітрит-аніона – стабільного метаболіту оксиду азоту корелює, тобто істотно залежить від кількості пошкоджених ендотеліальних клітин.

Останнім часом дослідники все більше уваги при різних патологічних станах звертають на стан ендотеліоцитів. Відомо, що останні являють собою активний ендокринний орган, що синтезує різні біологічно активні субстанції, необхідні для регуляції життєво важливих процесів організму (згортання крові, тонус судин, функціональна активність нирок, скоротливість серця, дифузія води, іонів, продуктів метаболізму) [13]. Ендотеліоцити також виконують бар'єрну, гемостатичну, реологічну, продукуючу, метаболічну, транспортну та репаративну функції. Вони відіграють важливу роль у ремоделюванні судинної стінки, тобто у змінах її структури та функції в різних фізіологічних і патологічних умовах [5, 14]. Ендотеліальні клітини також синтезують оксид азоту (NO) – ендотеліальну субстанцію релаксації судин. Звідси випливає, що порушення структури значної кількості ендотеліоцитів призводить до їх дисфункції, блокади NO-синтази, зниження синтезу NO й активації процесів його деградації. Наведені явища супроводжуються спазмом та звуженням судин, що не лише підтримує, але й посилює гіпоксію, набряк, дистрофію та некробіотичні зміни в клітинах і тканинах [5, 7, 13] з подальшою інфільтрацією та розвитком кардіосклерозу.

На основі отриманих результатів проведених досліджень та літературних даних можна зробити висновок, що пострезекційна артеріальна легенева гіпертензія призводить до розвитку легеневого серця і вираженої структурної перебудови переважно артерій дрібного калібру шлуночків серця, яка характеризується потовщенням їх стінки, звуженням просвіту, зниженням їх пропускної здатності, гіпоксією, пошкодженням ендотеліоцитів, ендотеліальною дисфункцією, гіпоксією, дистрофічними та некробіотичними змінами клітин і тканин, осередками інфільтрації та кардіосклерозу. Виявлені зміни переважали у правому шлуночку та при декомпенсації легеневого серця.

ВИСНОВКИ. Тривала пострезекційна артеріальна легенева гіпертензія призводить до

вираженої структурної перебудови переважно артерій дрібного калібру шлуночків серця, яка характеризується потовщенням стінки судин, звуженням їх просвіту та ураженням ендотеліоцитів, ендотеліальною дисфункцією, погіршенням кровопостачання серцевого м'яза, гіпоксією, дистрофічними, некробіотичними змінами клітин і тканин, інфільтративними та склеротичними процесами. Виявлені патоморфологічні та біохімічні зміни домінували у правому шлуночку і при декомпенсації легеневого серця.

Перспективи подальших досліджень.

Детальне всестороннє вивчення цих явищ є перспективним з метою їх врахування при діагностиці, корекції та профілактиці уражень міокарда за умов пострезекційної артеріальної легеневої гіпертензії.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Автандилов Г. Г. Основы количественной патологической анатомии / Г. Г. Автандилов. – М. : Медицина, 2002. – 240 с.
2. Амосова К. М. Клінічний перебіг та стан міокарда з хронічним легеним серцем унаслідок хронічної обструктивної патології легень залежно від наявності легеневої гіпертензії / К. М. Амосова, Л. Ф. Конопльова, І. Д. Мазур // Серце і судини. – 2009. – № 2. – С. 48–52.
3. Власенко М. А. Механизмы развития сердечной недостаточности у больных с хронической обструктивной болезнью сердца / М. А. Власенко, Е. Ю. Смоляник, Э. М. Ходош // Вісник проблем біології і медицини. – 2010. – Вип. 2. – С. 43–48.
4. Герасимюк І. Є. Структурно-просторова перебудова коронарних артерій після двобічної обширної резекції легень / І. Є. Герасимюк, С. А. Заячківський // Проблеми, досягнення і перспективи розвитку медико-біологічних наук і практичного здравоохранения. – Симферополь : Издательский центр КГМУ, 2002. – **138**, часть 3. – С. 28–31.
5. Гнатюк М. С. Особливості ремоделювання артерій міокарда при токсичному ураженні / М. С. Гнатюк, А. М. Пришляк // Вісник наукових досліджень. – 2005. – № 3. – С. 134–136.
6. Жарінов О. Й. Профілактика серцевої недостатності / О. Й. Жарінов // Серце і судини. – 2004. – № 2 (8). – С. 96–104.
7. Калінкіна Н. В. Ремоделювання артерій при серцево-судинних захворюваннях / Н. В. Калінкіна, О. К. Кашанська, Є. В. Кетінг // Серце і судини. – 2004. – № 4 (8). – С. 87–91.
8. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях Excell / С. Н. Лапач, А. В. Губенко, П. Н. Бабич. – К. : Морион, 2001. – 410 с.
9. Міщенко В. І. Реакції перекисного окислення ліпідів і гемостазу у різних тканинах організму при гострому емоційно-больовому стресі / В. І. Міщенко // Фізіол. журн. – 2002. – **48**, № 6. – С. 66–69.
10. Саркисов Д. С. Структурные основы адаптации и компенсации нарушенных функций / Д. С. Саркисов. – М. : Медицина, 1997. – 448 с.
11. Сорочинников А. Г. Гистологическая и микроскопическая техника / А. Г. Сорочинников, А. Е. Доросевич. – М. : Медицина, 1997. – 448 с.
12. Черкасов В. В. Ядерно-глазматическое отношение в клетках тканей позвоночных дисков человека и животных в связи с возрастом / В. В. Черкасов // Проблемы старения и долголетия. – 1993. – **3**, № 2. – С. 112–119.
13. Шестакова С. В. Дисфункция эндотелия – причина или следствие метаболического синдрома / С. В. Шестакова // Рос. мед. журн. – 2001. – № 2. – С. 88–90.
14. Шорманов С. В. Морфологические изменения сосудов печени при экспериментальной коарктации аорты и после ее устранения / С. В. Шорманов, С. В. Куликов // Морфология. – 2003. – **124**, № 4. – С. 61–65.
15. Barnes P. Y. Chronic obstructive pulmonary disease molecular and cellular mechanisms / P. Y. Barnes, D. Shapiro, R. A. Pakwels // Eur. Respirat. J. – 2003. – **22**. – P. 672–678.

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В АРТЕРИЯХ ЖЕЛУДОЧКОВ СЕРДЦА ПРИ ПОСТРЕЗЕКЦИОННОЙ ЛЕГОЧНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ

Резюме

Комплексом биохимических, морфологических и морфометрических методов установлено, что правосторонняя пульмонэктомия осложняется развитием легочного сердца и выраженной структурной перестройкой артерий мелкого калибра его желудочков. Ремоделирование артерий характеризуется утолщением стенки, сужением просвета, повреждением эндотелиоцитов, существенным уменьшением пропускной способности этих сосудов и ухудшением кровоснабжения исследуемого органа. Выявлено сильную отрицательную корреляционную связь между содержанием нитрит-аниона в желудочках и относительным объемом пораженных эндотелиоцитов, что доминировало в правом желудочке при декомпенсации легочного сердца.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: пострезекционная легочная гипертензия, артерии, желудочки сердца, нитрит-анион.

L. V. Tatarchuk
I. YA. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

PECULIARITIES OF STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHANGES IN ARTERIES VENTRICLES OF THE HEART AT POSTRESECTION PULMONARY HYPERTENSION

Summary

The peculiarities of remodeling arteries ventricles of the heart were studied by biochemical, morphological and morphometric methods of postresection pulmonary arterial hypertension. It was established that the model pathology results in thickening of the arterial wall, narrowing of their spaces, affection of small arteries, endotheliocytes that led to their dysfunction, decreasing of organ blood supply, hypoxia, dystrophic and necrobiotic changes of tissues and cells. Important negative correlation was established between concentration nitrit-anion in ventricles of the heart and relative extend of affected endotheliocytes arteries which prevail in right ventricle of decompensated cor pulmonale.

KEY WORDS: postresection pulmonary hypertension, arteries, ventricles of the heart, nitrit-anion.

Отримано 30.07.12

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

ВІРТУАЛЬНИЙ СКРИНІНГ ТА СИНТЕЗ НОВИХ N-АЦИЛЬНИХ ПОХІДНИХ S-(2-МЕТИЛХІНОЛІН-4-ІЛ)-L-ЦИСТЕЇНУ ЯК ПОТЕНЦІЙНИХ БІОРЕГУЛЯТОРІВ НАПРАВЛЕНОЇ ДІЇ

Проведено віртуальний скринінг потенційних біорегуляторів серед нових N-ацильних похідних S-(2-метилхінолін-4-іл)-L-цистеїну. Створено комбінаторну бібліотеку та встановлено можливі спектри біологічної активності цих сполук. Синтезовано нові N-ацильні похідні S-(2-метилхінолін-4-іл)-L-цистеїну та підтверджено ідентичність отриманих сполук.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: віртуальний скринінг, комбінаторна бібліотека, біорегулятори, синтез.

ВСТУП. На сьогодні виявлено зв'язок між багатьма захворюваннями та процесами вільнорадикального окиснення. Процеси вільнорадикального окиснення можуть бути причиною багатьох захворювань: запальні процеси, гіпоксичні й реперфузійні пошкодження тканин, бронхолегеневі захворювання, старіння та ін. Тому створення ефективних направлених біорегуляторів є одним з актуальних завдань фармацевтичної, медичної та біоорганічної хімії.

Пошук препаратів – антиоксидантів, направлених на пригнічення цих процесів, ускладнився тим, що було переглянуто відомий механізм прямого антиоксидантного захисту клітини і тканин. З'являється все більше доказів того, що загальна ефективність таких препаратів здебільшого пов'язана з багатьма іншими особливостями хімічної будови сполук, тому перспективними є продовження пошуку та вдосконалення нових направлених антиоксидантів і встановлення механізму їх дії.

Активация вільнорадикального пероксидного окиснення ліпідів – провідний механізм дії багатьох несприятливих чинників та хімічних агентів, тому необхідним є використання препаратів, що здатні протистояти окисному стресу [17].

У ході досліджень останніх років виявлено антиоксидантні, гепатопротекторні, радіопротекторні властивості, мембранозахисну дію 4-тіопохідних хіноліну, S-(хінолін-4-іл)заміщених цистеїну [1, 3-7, 9, 10, 14, 16], а також N-ацильних похідних S-(2-метилхінолін-4-іл)-

© Є. О. Уліщенко, О. А. Бражко, Л. О. Омелянчик, В. І. Генчева, О. О. Бражко, 2012.

L-цистеїну, які нормалізують гомеостаз на фоні їх малої токсичності [2, 12].

У роботах [11, 13] наведено комп'ютерний прогноз біологічної активності деяких S-(хінолін-4-іл)заміщених цистеаміну як основу для пошуку та оптимізації базових структур біологічно активних сполук, а також віртуальний скринінг N-ацетильних похідних S-(гетерил)-L-цистеїну, де проаналізовано прогнозовані види активності, залежність структури від прогнозованого виду біологічних активностей.

Метою даної роботи було продовжити пошук нових перспективних біорегуляторів серед N-ацильних похідних S-(2-метилхінолін-4-іл)-L-цистеїну шляхом модифікації в карбоксильній групі (збільшення ліпофільності, отримання водорозчинних форм) та введення нових N-ацильних залишків у структуру цистеїну.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Прогноз біологічної активності N-ацильних похідних S-(2-метилхінолін-4-іл)-L-цистеїну проведено за допомогою комп'ютерної програми *PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances)*. Комп'ютерна програма *PASS* прогнозує за структурною формулою хімічної речовини понад 1200 видів біологічної активності, що включають основні й побічні фармакологічні ефекти, механізм дії, мутагенність, канцерогенність, тератогенність та ембріотоксичність. Прогноз імовірної активності характеризується показниками вірогідності прояву активності (Pa) та її відсутності (Pi), що мають значення від 0 до 1. Оскільки ці ймовірності розраховуються незалежно по підвибірках активних та неактивних сполук, їх сума не дорівнює 1. Через те, що Pa і Pi є мі-

рами приналежності сполуки до активних або неактивних речовин, то найочікуванішими в експерименті будуть такі активності, що матимуть більше значення (Pa) та менше значення (Pi). Робота даної системи основана на аналізі залежностей “структура–активність” для речовин з вибірки біологічно активних речовин (субстанції лікарських препаратів, фармакологічно активні сполуки) [8, 15].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. В результаті віртуального скринінгу відібрали N-ацильні похідні S-(2-метилхінолін-4-іл)-L-цистеїну, які в подальшому було синтезовано. Дані попередньої оцінки біологічної активності сполук наведено в таблиці 1.

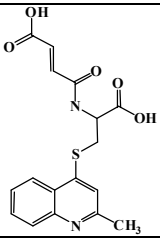
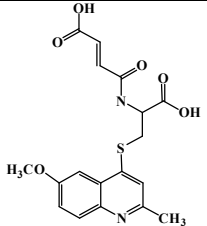
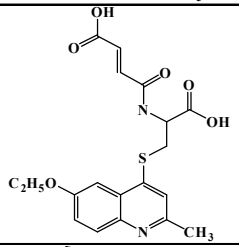
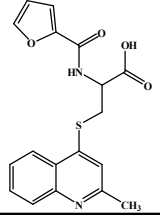
Для похідних малеїнової кислоти (сполуки 1–3) прогноуються противиразкова (Pa=0,684–0,693), противірусна (Pa=0,600–0,636), антибактеріальна (Pa=0,525–0,623), антиметастатична (Pa=0,556–0,611) активності. Поява метоксигрупи в 6-му положенні хінолінового циклу (сполука 2) призводить до поси-

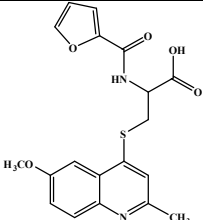
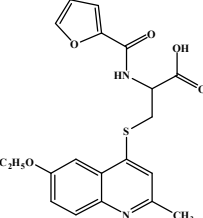
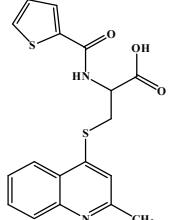
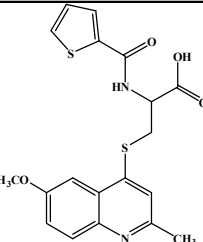
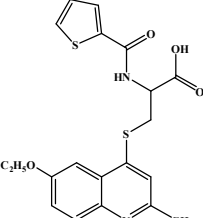
лення антиметастатичної, зниження прояву антибактеріальної активності, появи кардіопротекторної активності порівняно зі сполукою 1. Заміна метоксигрупи у 6-му положенні хінолінового циклу на етоксигрупу (сполука 3) впливає на незначне посилення противиразкової активності, зниження антиметастатичної активності, появи активності у лікуванні репродуктивних дисфункцій, цитопротекторної активності порівняно зі сполукою 2.

Перехід до гетерилацільних похідних значною мірою змінює вид біологічної активності (сполуки 4–9): протизапальна активність, антирадикальна, лікування м'язової дистрофії, бічного аміотрофічного склерозу, лікування психосексуальних дисфункцій. Вірогідність прояву (Pa) активностей доволі висока.

В ряді фуроїлзаміщених S-(2-метилхінолін-4-іл)-L-цистеїну (сполуки 4–6) зі значною інтенсивністю прогноуються активність при лікуванні бічного аміотрофічного склерозу (Pa=0,640–0,701), антирадикальна активність (Pa=0,526–0,567), активність при лікуванні

Таблиця 1 – Прогноз біологічної активності нових N-ацильних похідних S-(2-метилхінолін-4-іл)-L-цистеїну

№ сполуки	Структура сполуки	Вид біологічної дії	Pa	Pi
1	2	3	4	5
1		Противиразкова Антибактеріальна Противірусна (<i>Arbovirus</i>) Антиметастатична	0,684 0,623 0,636 0,556	0,005 0,033 0,054 0,041
2		Противиразкова Противірусна (<i>Arbovirus</i>) Антиметастатична Антибактеріальна Кардіопротекторна	0,671 0,600 0,611 0,525 0,499	0,006 0,075 0,005 0,050 0,016
3		Противиразкова Антиметастатична Муколітична Цитопротекторна Лікування репродуктивних дисфункцій	0,693 0,581 0,541 0,514 0,575	0,005 0,018 0,020 0,076 0,087
4		Лікування бічного аміотрофічного склерозу Антирадикальна Протизапальна (кишечник) Лікування психосексуальних дисфункцій	0,701 0,567 0,583 0,560	0,029 0,033 0,057 0,053

1	2	3	4	5
5.		Лікування бічного аміотрофічного склерозу Протизапальна (кишечник) Антирадикальна Лікування психосексуальних дисфункцій	0,673 0,598 0,558 0,556	0,074 0,049 0,048 0,031
6		Лікування бічного аміотрофічного склерозу Протизапальна (кишечник) Антирадикальна Лікування психосексуальних дисфункцій	0,640 0,609 0,526 0,495	0,088 0,044 0,037 0,079
7		Противірусна (Arbovirus) Протизапальна (кишечник) Лікування м'язової дистрофії Лікування бічного аміотрофічного склерозу Лікування хронічної обструктивної хвороби легень Антирадикальна	0,767 0,725 0,634 0,659 0,558 0,540	0,009 0,012 0,017 0,080 0,005 0,034
8		Противірусна (Arbovirus) Протизапальна (кишечник) Лікування м'язової дистрофії Лікування бічного аміотрофічного склерозу Лікування психосексуальних дисфункцій Антирадикальна	0,751 0,721 0,563 0,632 0,578 0,556	0,013 0,013 0,032 0,091 0,048 0,031
9		Противірусна (Arbovirus) Протизапальна (кишечник) Лікування м'язової дистрофії Лікування хронічної обструктивної хвороби легень Лікування бічного аміотрофічного склерозу Антирадикальна	0,742 0,715 0,555 0,665 0,584 0,526	0,006 0,012 0,034 0,055 0,098 0,037

психосексуальних дисфункцій ($P_a=0,495-0,560$).

Наявність метокси-, етоксигруп у 6-му положенні хінолінового циклу (сполуки 5, 6) знижує прогнозовані активності щодо лікування бічного аміотрофічного склерозу, лікування психосексуальних дисфункцій; антирадикальної активності, впливає на підвищення прояву протизапальної активності порівняно зі сполукою 4.

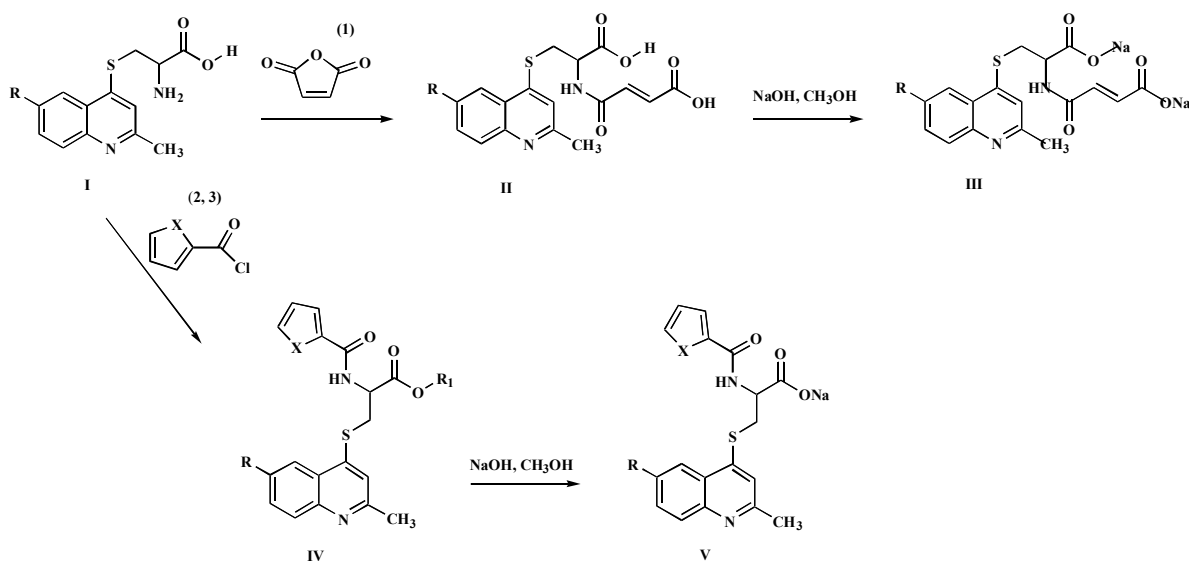
В ряді тісноїзаміщених S-(2-метилхінолін-4-іл)-L-цистеїну (сполуки 7–9) прогноуються висока противірусна ($P_a=0,742-0,767$), протизапальна ($P_a=0,715-0,725$) активності, лікування хронічної обструктивної хвороби легень ($P_a=0,558-0,665$), лікування м'язової дистро-

фії ($P_a=0,555-0,634$), лікування бічного аміотрофічного склерозу ($P_a=0,584-0,659$), антирадикальної активності ($P_a=0,526-0,540$), дія яких також дещо зменшується при введенні в 6-те положення хінолінового ядра алкоксигруп (сполуки 8, 9).

Проведення комп'ютерного прогнозу біологічної активності N-ацильних похідних S-(2-метилхінолін-4-іл)-L-цистеїну за допомогою програми PASS показало перспективність вивчення даних речовин як ефективних субстанцій при лікуванні психосексуальних дисфункцій, бічного аміотрофічного склерозу, м'язової дистрофії, хронічної обструктивної хвороби легень, а також як пасток вільних радикалів, противірусних, протизапальних препаратів.

Синтез N-ацильних S-(2-метилхінолін-4-іл)-L-цистеїну проводили в лабораторії біотехноло-

гії фізіологічно активних речовин Запорізького національного університету за такою схемою:



Для отримання похідних дикарбонових кислот (сполук 1–3) до сполуки 1 додавали 12 ммоль малеїнового ангідриду (1) і розчиняли у мінімальній кількості свіжоперегнаного ацетону. Реакція перебігала 15 хв, після чого спостерігали випадання карамелі. Надосадову рідину зливали; карамель розчиняли при нагріванні в надлишку метанолу. Надлишок метанолу (2/3 частини) відганяли під вакуумом водострумною помпи й охолоджували до температури -10 °C, осад (II за схемою; сполуки 1–3) відфільтровували та сушили. Перекристалізовували в системі метанол–оцтова кислота (10:1). Вихід продуктів – 70–82 % (сполуки 1–3).

Для отримання N-фуроїл-, тієноїлзаміщених S-(2-метилхінолін-4-іл)-L-цистеїну 10 ммоль дигідрохлориду (I) (розчиняли в 5 мл дистильованої води), який охолоджували до температури 3 °C при інтенсивному перемішуванні, по краплях додавали 12 ммоль відповідного хлорангідриду (II або III за схемою) і охолоджений 40 % водний розчин натрію гідроксиду так, щоб середовище розчину зберігалось у межах pH=7–7,5. Отримали фуроїл-, тієноїлзаміщені N-ацильні похідні S-(2-метилхінолін-4-іл)-L-цистеїну (IV за схемою). Провели перекристалізацію в системі метанол–оцтова кислота (10:1). Вихід продуктів – 75–82 % (сполуки 4–9).

Для одержання водорозчинних форм натрієвих (III) і динатрієвих солей (V) відповідні кислоти (II, IV) розчиняли у метанолі при додаванні еквімолярної кількості насиченого метанольного розчину натрію гідроксиду (у

разі похідних дикарбонових кислот 2 еквівалента натрію гідроксиду), перемішували, охолоджували до температури 7 °C. Отримані розчини упарювали під вакуумом. Вихід – 88–90 % (III, V за схемою).

Експериментальні дані елементного аналізу досліджуваних сполук відповідають розрахунковим, які здійснено за допомогою хімічної програми ChemDraw 11.0.

Індивідуальність синтезованих N-ацильних похідних S-(2-метилхінолін-4-іл)-L-цистеїну підтвердили ПМР-спектрами, які було знято на приладі Bruker AC-300 (300 МГц) в ДМСО-d₆+CCl₄ (1:1), внутрішній стандарт – ТМС, величини хімічних зміщень (δ) вимірювали з точністю до 0,01 м.ч.

Фізико-хімічні властивості, ПМР-спектри N-ацильних похідних S-(2-метилхінолін-4-іл)-L-цистеїну наведено в таблиці 2.

Значення LogP, як видно з таблиці 2, коливається в межах 1,66–3,81; цей показник збільшується у зв'язку з різними N-ацильними залишками у 4-му положенні хінолінового циклу. Введення метоксигрупи в 6-те положення хінолінового циклу зменшує ліпофільність (сполука 2), етоксигрупи – збільшує (сполука 3). Ця тенденція спостерігається і для фуроїл-, тієноїлзаміщених S-(2-метилхінолін-4-іл)-L-цистеїну (сполуки 4–9).

ПМР-спектри N-ацильних S-(2-метилхінолін-4-іл)-L-цистеїну мають сигнал у вигляді мультиплету при δ=6,60–8,10 м.ч., що відповідає протонам ароматичного кільця хінолінового ядра.

Таблиця 2 – Фізико-хімічні властивості, ПМР-спектри N-ацильних похідних S-(2-метилхінолін-4-іл)-L-цистеїну

№ сполуки	Брутто-формула	LogP	Хімічний зсув, δ , м.ч.		
			Н аром. м	NH, д	Інші протони
1	C ₁₇ H ₁₆ N ₂ O ₅ S	1,66	7,35–7,90	8,50	2,56 (CH ₃ , c); 3,60 (SCH ₂ , т/м)
2	C ₁₈ H ₁₈ N ₂ O ₆ S	1,54	7,55–7,90	8,30	2,50 (CH ₃ , c); 3,40 (SCH ₂ , т/м); 3,60 (OCH ₃ , c)
3	C ₁₉ H ₂₀ N ₂ O ₆ S	1,87	7,20–7,80	8,45	2,40 (CH ₃ , c); 3,60 (SCH ₂ , т/м); 4,0 (OCH ₂ , k)
4	C ₁₈ H ₁₆ N ₂ O ₄ S	2,23	6,70–8,10	8,80	2,60 (CH ₃ , c); 3,60 (SCH ₂ , т/м)
5	C ₁₉ H ₁₈ N ₂ O ₅ S	2,10	6,75–7,90	8,90	2,60 (CH ₃ , c); 3,65 (SCH ₂ , т/м); 3,85 (OCH ₃ , c)
6	C ₂₀ H ₂₀ N ₂ O ₅ S	2,44	6,60–7,90	8,75	2,60 (CH ₃ , c); 3,60 (SCH ₂ , т/м); 4,75 (NCH, k); 4,0 (OCH ₂ , k)
7	C ₁₈ H ₁₆ N ₂ O ₃ S ₂	3,60	7,2–7,90	8,95	2,60 (CH ₃ , c); 3,60 (SCH ₂ , т/м); 4,75 (NCH, k)
8	C ₁₉ H ₁₈ N ₂ O ₄ S ₂	3,47	7,1–7,85	8,85	2,60 (CH ₃ , c); 3,65 (SCH ₂ , т/м); 3,80 (OCH ₃ , c); 4,70 (NCH, k)
9	C ₂₀ H ₂₀ N ₂ O ₄ S ₂	3,81	7,15–7,90	8,80	2,60 (CH ₃ , c); 3,75 (SCH ₂ , т/м); 4,1 (OCH ₂ , k); 4,75 (NCH, k)

Для протона амідної групи в більш слабкому полі спостерігається сигнал у вигляді дуплету при $\delta=8,30-8,95$ м.ч.

Тіометиленовий фрагмент (SCH₂) розчеплюється в подвійний мультиплет, наближений від середнього поля до більш сильного ($\delta=3,40-3,75$ м.ч.).

Замісники в 6-му положенні хінолінового циклу відбиваються характерними синглетами та квадруплетами в середньому полі, відповідно, для метокси-(-OCH₃) та етоксигруп (-OCH₂) ($\delta=3,60-3,80$ м.ч., $\delta=4,00-4,10$ м.ч. відповідно).

Таким чином, результати аналізу ПМР-спектрів отриманих сполук вказують на відповідність структур синтезованих сполук.

ВИСНОВКИ. 1. Створено комбінаторну бібліотеку нових N-ацильних похідних S-(2-метилхінолін-4-іл)-L-цистеїну та визначено найбільш перспективні сполуки для їх подальшого біологічного дослідження.

2. Проведено синтез N-ацильних похідних S-(2-метилхінолін-4-іл)-L-цистеїну та підтверджено їх структуру за допомогою ПМР-спектрів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Антиоксидантна та гепатопротекторна активність натрієвих солей похідних β -(2-метилхінолін-4-ілтіо)-молочної кислоти / [М. П. Завгородній, І. Ф. Беленічев, Л. О. Омелянчик та ін.] // Питання біоіндикації та екології. – Запоріжжя, 2004. – Вип. 9, № 2. – С. 149–157.
2. Біологічна активність нових S-гетерилзаміщених ацетилцистеїну / [І. Б. Лабенська, Л. О. Омелянчик, Н. В. Гаврюшенко та ін.] // Вісник Запорізького національного університету : Збірник наукових статей. Біологічні науки. – Запоріжжя : Запорізький національний університет, 2005. – № 1. – С. 113–119.
3. Бражко О. А. Дослідження біологічної дії 4-тіопохідних хіноліну / О. А. Бражко, Л. О. Омелянчик, І. Ф. Беленічев [та ін.] // Мед. хімія. – 2003. – 3, № 1. – С. 20–23.
4. Генчева В. І. Вивчення біологічної дії деяких 4-S-похідних хіноліну / В. І. Генчева, Л. О. Омелянчик, О. А. Бражко // Біополімери і клітина. – 2006. – 22, № 6. – С. 475–479.
5. Генчева В. І. Дослідження антирадикальної активності похідних 2-метил-8-метокси-4-тіохіноліну / В. І. Генчева, Л. О. Омелянчик, О. А. Бражко // Вісник Запорізького національного університету :

Збірник наукових статей. Біологічні науки. – Запоріжжя : Запорізький національний університет, 2005. – № 1. – С. 71–74.

6. Генчева В. І. Пошук антиоксидантів серед похідних 8-метоксизаміщених 4-меркаптохінолінів / В. І. Генчева, Л. О. Омелянчик, О. А. Бражко // Питання біоіндикації та екології. – 2006. – Вип. 11, № 1. – С. 194–199.

7. Громова В. П. Дослідження антиоксидантної активності тіопохідних хіноліну / В. П. Громова, О. А. Бражко, М. П. Завгородній // Укр. біохім. журн. – 2005. – 77, № 3. – С. 87–95.

8. Інтернет-система прогноза спектра біологічної активності хімічних сполук / А. В. Садим, А. А. Лагунин, Д. А. Филимонов, В. В. Порошков // Хіміко-фармац. журн. – 2001. – 36, № 10. – С. 21–26.

9. Корнет М. М. Біологічна активність деяких S-(хінолін-4-іл)заміщених цистеїну / М. М. Корнет, О. А. Бражко, М. П. Завгородній // Біологія XXI століття: теорія, практика, викладання : матеріали Міжнародної конференції. – Київ : Фітосоціоцентр, 2007. – С. 62–63.

10. Корнет М. М. Біологічна активність деяких S-(хінолін-4-іл)заміщених цистеїну / М. М. Корнет,

О. А. Бражко, М. П. Завгородній // Мед. хімія. – 2007. – 9, № 2. – С. 65-69.

11. Корнет М. М. Комп'ютерний прогноз біологічної активності деяких S-(хінолін-4-іл)заміщених цистеаміну як основа для пошуку та оптимізації базових структур біологічно активних сполук / М. М. Корнет, О. А. Бражко, Л. О. Омелянчик // Вісник Запорізького національного університету : Збірник наукових статей. Біологічні науки. – Запоріжжя : Запорізький національний університет, 2007. – № 1. – С. 106–111.

12. Лабенська І. Б. Біологічна активність S-гетерилзаміщених L-ацетилцистеїну / І. Б. Лабенська, Л. О. Омелянчик, О. А. Бражко // Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики : зб. наук. статей. – 2006. – Вип. 15, Т. 3. – С. 596.

13. Лабенська І. Б. Віртуальний скринінг N-ацетильних похідних S-гетерил-L-цистеїну / І. Б. Лабенська, Л. О. Омелянчик, О. А. Бражко // Збірка матеріалів Міжнародної конференції "Сучасні проблеми біології, екології та хімії", присвяченої 20-річчю біологічного факультету ЗНУ, 29 березня–1 квітня 2007 р. – Запоріжжя, 2007. – С. 556–558.

14. Омелянчик Л. О. Пошук біореґуляторів з антиоксидантною дією серед S-похідних 4-меркаптохінолінів / Л. О. Омелянчик, Д. М. Федоряк, О. А. Бражко // *Ukrainica Bioorganica Acta*. – 2007. – № 2. – С. 17–24.

15. Поройков В. В. Компьютерный прогноз биологической активности химических соединений как основа для поиска и оптимизации базовых структур новых лекарств / В. В. Поройков, Д. А. Филимонов // Азотистые гетероциклы и алкалоиды. – М. : Иридиум-пресс, 2001. – Т. 1. – С. 123–129.

16. Рильський О. Ф. Дослідження біологічної активності деяких похідних хіноліну / О. Ф. Рильський, О. А. Бражко, М. М. Корнет // Вісник Запорізького національного університету : Збірник наукових статей. Біологічні науки. – Запоріжжя : Запорізький національний університет, 2005. – № 1. – С. 146–151.

17. Шаповал Г. С. Механизмы антиоксидантной защиты организма при действии активных форм кислорода / Г. С. Шаповал, В. Ф. Громова // Укр. біохім. журн. – 2003. – № 2. – С. 5–13.

Е. А. Улищенко, А. А. Бражко, Л. А. Омелянчик, В. И. Генчева, Е. А. Бражко
ЗАПОРІЖСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ВИРТУАЛЬНИЙ СКРИНІНГ І СИНТЕЗ N-АЦИЛЬНИХ ПРОИЗВОДНИХ S-(2-МЕТИЛХІНОЛІН-4-ІЛ)-L-ЦИСТЕЇНИ КАК ПОТЕНЦІАЛЬНИХ БІОРЕГУЛЯТОРОВ НАПРАВЛЕННОГО ДЕЙСТВИЯ

Резюме

Проведен виртуальний отбір потенціальних біореґуляторів среди нових N-ацильних производних S-(2-метилхінолін-4-іл)-L-цистеїни. Создана комбінаторна бібліотека і определены возможные спектры биологической активности этих соединений. Синтезированы новые N-ацильные производные S-(2-метилхінолін-4-іл)-L-цистеїни і підтверджена ідентичність полученных соединений.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: виртуальний скринінг, комбінаторна бібліотека, біореґулятори, синтез.

Ye. O. Ulishchenko, O. A. Brazhko, L. O. Omelyanchyk, V. I. Hencheva, O. O. Brazhko
ZAPORIZHIAN NATIONAL UNIVERSITY

VIRTUAL SCREENING AND SYNTHESIS OF N-ACYL DERIVATIVES OF S-(2-METHYLQUINOLIN-4-YL)-L-CYSTEINE AS POTENTIAL BIOREGULATORS OF THE DIRECTED ACTION

Summary

A virtual selection of potential bioregulators of the new N-acyl derivatives S-(2-methylquinolin-4-yl)-L-cysteine was conducted. Combinatorial library was designed and possible spectrum of biological activity of given compounds was identified. New N-acyl derivatives of S-(2-methyl-quinolin-4-yl)-L-cysteine were synthesized, the identity of the compounds was confirmed.

KEY WORDS: virtual selection, combinatorial library, bioregulators, synthesis.

Отримано 06.03.12

Адреса для листування: Е. О. Улищенко, вул. Леніна, 51, кв. 21, Запоріжжя, 69097, Україна, e-mail: astra-sintez@rambler.ru.

АНАЛІЗ ОБ'ЄКТИВНОСТІ НОВІТНІХ МЕТОДИК ОЦІНЮВАННЯ ПРИ ВИКЛАДАННІ БІОЛОГІЧНОЇ ТА БІООРГАНІЧНОЇ ХІМІЇ

У статті розкрито досвід впровадження новітніх методик оцінювання при викладанні біологічної та біоорганічної хімії у Тернопільському державному медичному університеті імені І. Я. Горбачевського, обґрунтовано об'єктивність комплексного семестрового тестового іспиту за результатами оцінювання модулів дисципліни.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: інноваційні методики, біологічна та біоорганічна хімія, незалежне тестування.

ВСТУП. Різноманітні сторони глобалізації світового співтовариства спричинили значний вплив і на розвиток освіти. До студентів та викладачів ставлять нові вимоги щодо використання сучасних інформаційних і комунікаційних технологій [1, 3]. Впровадження новітніх технологій у медичній освіті вимагає нового підходу до організації навчального процесу і, зокрема, системи оцінювання [5]. Проте не до кінця вирішеною залишається проблема розробки справді об'єктивної та незалежної системи оцінювання, яка б не залежала від впливу людського чинника.

У Тернопільському державному медичному університеті імені І. Я. Горбачевського впроваджено нову систему організації навчального процесу, важливою складовою якої є незалежне оцінювання знань студентів шляхом проведення комплексного семестрового тестового іспиту [2, 4, 6].

Метою даної роботи було обґрунтувати об'єктивність оцінювання знань із біологічної та біоорганічної хімії у формі комплексного семестрового тестового іспиту.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Для семестрового тестування використовували запитання з багатьма варіантами відповідей у формі бланкових тестів та наступною автоматизованою обробкою результатів. Після проведення іспиту аналізували тестові завдання на валідність із складанням гістограм успішності відповідей на кожне запитання. Здійснювали кореляційний аналіз методом квадратів Пірсона. Відмінності між групами відносних та середніх величин і

© В. П. Марценюк, П. Р. Сельський, 2012.

їх похибками оцінювали за допомогою критерію Стюдента. Відмінності вважали достовірними при рівні $p < 0,05$. Для обробки використано пакети програм MS Excel (Microsoft Office 2003).

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Семестровий комплексний тестовий іспит для оцінювання знань з фундаментальних медичних дисциплін впроваджено в університеті з 2006/2007 навчального року. На даний час створено велику базу тестових завдань із біологічної та біоорганічної хімії (близько 4 тисяч). Комп'ютерна програма довільно формує буклети з розрахунку 24 завдання на модуль. Студент на іспиті отримує також збірник рисунків, де представлено прилади, схеми, формули, графіки тощо. Тестові запитання до рисунків включено окремим розділом у буклеті. Після проведення іспиту здійснюють обов'язковий статистичний аналіз тестових завдань, які використовували для тестування, на валідність. Для цього всіх студентів ранжують на 5 груп відповідно до загального результату іспиту. Гістограма успішності відповідей на запитання будується на основі результатів студентів у даних групах. Для валідних тестових завдань спостерігається монотонне спадання гістограм від групи найуспішніших студентів до найслабших (рис.).

Про об'єктивність оцінювання знань студентів із біологічної та біоорганічної хімії (2010/2011 н.р., 2011/2012 н.р.) за методикою семестрового комплексного тестового іспиту свідчать результати тестування з модулів: "Біологічно важливі класи біоорганічних сполук. Біополімери та їх структурні компоненти"

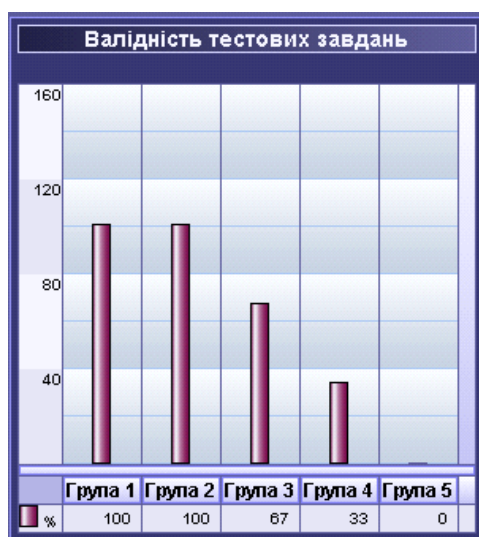


Рис. Гістограма валідності для валідного запитання.

(1-й модуль), “Загальні закономірності метаболізму” (2-й модуль), “Метаболізм вуглеводів, ліпідів, амінокислот та його регуляція” (3-й модуль), “Молекулярна біологія. Біохімія міжклітинних комунікацій” (4-й модуль) та “Біохімія тканин та фізіологічних функцій” (5-й модуль) (табл.1). 1-й модуль складали у 2010/2011 н.р. (весняна сесія) 320 студентів 1-го курсу. На “незадовільно” склали іспит 142 студенти ((44,38±2,78) %), 99 ((30,94±2,58) %) студентів склали тестування на “задовільно”, 60 студентів ((18,75±2,18) %) – на “добре”, а 19 студентів ((5,94±1,32) %) – на “відмінно”. За результатами тестування тих же студентів на 2-му курсі з 2-го модуля (зима, 2011/2012 н.р.), 4-го і 5-го

модулів (весна, 2011/2012 н.р.), спостерігалась значно менша частка незадовільних оцінок (2-й модуль – (27,94±2,43) %, 4-й модуль – (17,96±2,10) %, 5-й модуль – (23,05±2,30) %) ($p<0,05$). Мала місце і менша частка незадовільних оцінок ((40,29±2,66) %) з 3-го модуля (зима, 2011/2012 н.р.), проте ця відмінність була несуттєвою ($p>0,05$). Порівняно з 1-м модулем виявлялась також тенденція до зменшення задовільних оцінок з 2-го, 3-го та 5-го модулів (2-й модуль – (24,12±2,32) %, 3-й модуль – (26,47±2,39) %, 5-й модуль – (25,75±2,39) %) ($p>0,05$), проте суттєва відмінність була лише з 4-го модуля ((23,05±2,30) %) ($p<0,05$). Частка студентів, які склали іспит на “добре”, була більшою з 2-го, 4-го та 5-го модулів (2-й модуль – (28,24±2,44) %, 4-й модуль – (35,03±2,61) %, 5-й модуль – (32,04±2,55) %) порівняно з 1-м модулем ($p<0,05$). Тенденція до збільшення відсотка добрих оцінок виявлялась і з 3-го модуля ((22,06±2,25) %) ($p>0,05$). Із 2-го, 3-го, 4-го та 5-го модулів спостерігалась також значно більша частка відмінних оцінок (2-й модуль – (19,71±2,16) %, 3-й модуль – (11,18±1,71) %, 4-й модуль – (23,95±2,33) %, 5-й модуль – (19,16±2,15) %) ($p<0,05$).

За результатами семестрового тестування, середній бал за іспит (табл. 2) складав з 1-го модуля (3,49±0,19) бала. За результатами тестування з 2-го, 3-го, 4-го та 5-го модулів, цей показник був значно меншим (2-й модуль – (5,42±0,21) бала, 3-й модуль – (4,16±0,21) бала, 4-й модуль – (6,38±0,20) бала, 5-й мо-

Таблиця 1 – Порівняльний аналіз успішності з біологічної та біоорганічної хімії за 2010/2011 і 2011/2012 н.р.

Модуль	Кількість студентів, п	Група студентів за результатами тестування			
		незадовільно, %	задовільно, %	добре, %	відмінно, %
1-й	320	44,38±2,78	30,94±2,58	18,75±2,18	5,94±1,32
2-й	340	27,94±2,43*	24,12±2,32	28,24±2,44*	19,71±2,16*
3-й	340	40,29±2,66	26,47±2,39	22,06±2,25	11,18±1,71*
4-й	334	17,96±2,10*	23,05±2,30*	35,03±2,61*	23,95±2,33*
5-й	334	23,05±2,30*	25,75±2,39	32,04±2,55*	19,16±2,15*

Примітка. * – $p<0,05$ порівняно з 1-м модулем.

Таблиця 2 – Порівняльний аналіз середнього бала поточної успішності й комплексного семестрового тестового іспиту з біологічної та біоорганічної хімії за 2010/2011 і 2011/2012 н.р. ($M\pm m$)

Модуль	Рік тестування	Середній бал		Відсоток невалідних запитань, %
		іспит	поточна успішність	
1-й	2010/2011 н.р., весна	3,49±0,19	7,16±0,08*	2,50
2-й	2011/2012 н.р., зима	5,42±0,21**	6,27±0,09**	1,38
3-й	2011/2012 н.р., зима	4,16±0,21**	6,66±0,10**	0,69
4-й	2011/2012 н.р., весна	6,38±0,20**	7,00±0,11*	1,39
5-й	2011/2012 н.р., весна	5,80±0,21**	6,90±0,11*	1,38

Примітка. * – $p<0,05$ порівняно із середнім балом за іспит; ** – $p<0,05$ порівняно з показником за 1-й модуль.

дуль – $(5,80 \pm 0,21)$ бала) ($p < 0,05$). Середній бал за поточну успішність з 1-го модуля склав $(7,16 \pm 0,08)$ бала. На такому ж рівні перебувала успішність і з 4-го $(7,00 \pm 0,11)$ бала та 5-го $(6,90 \pm 0,11)$ бала) модулів ($p > 0,05$). Значно нижчий середній бал за поточну успішність, порівняно з 1-м модулем, виявлявся з 2-го $(6,27 \pm 0,09)$ бала та 3-го $(6,66 \pm 0,10)$ бала) модулів ($p < 0,05$). Слід також зазначити, що показники середніх балів за поточну успішність зі всіх модулів були нижчими порівняно з відповідними показниками за тестування ($p < 0,05$).

Кореляційний аналіз виявив прямий середній кореляційний зв'язок $(+0,5)$ між балами за поточну успішність та семестрове тестування зі всіх модулів.

Статистичний аналіз тестових завдань, які використовували на тестуванні, показав незначну частку невалідних запитань з біологічної та біоорганічної хімії (1-й модуль – 2,50 %, 2-й модуль – 1,38 %, 3-й модуль – 0,69 %, 4-й модуль – 1,39 %, 5-й модуль – 1,38 %).

ВИСНОВКИ. 1. Впровадження новітніх навчальних технологій значно покращує ефективність засвоєння знань студентів з біологічної та біоорганічної хімії, про що свідчать зменшення часток незадовільних і задовільних оцінок та збільшення часток

добрих і відмінних оцінок, а також вищий середній бал за семестровий тестовий іспит із модулів, які студенти складали на 2-му курсі порівняно з 1-м курсом.

2. Відсутність суттєвої відмінності середніх балів за іспит між 1-м, 2-м та 5-м модулями, а також наявність різниці між даними показниками зі всіх модулів у межах одного бала за п'ятибальною системою вказують на те, що комплексний семестровий тестовий іспит є об'єктивною формою незалежного оцінювання знань з біологічної та біоорганічної хімії.

3. Про об'єктивність семестрового тестування свідчать і незначна частка невалідних запитань та виявлений середній кореляційний зв'язок між балами за іспит і відповідними показниками за поточну успішність зі всіх модулів.

4. Вищі показники середнього бала за поточну успішність, порівняно із середніми балами за іспит за обидва навчальні роки, свідчать про необхідність удосконалення оцінювальних методик на заняттях та подальшої роботи з відбору якісного контенту для формування тестових завдань.

5. Подальші дослідження з удосконалення навчальних і оцінювальних методик при викладанні біологічної та біоорганічної хімії суттєво покращать якість підготовки висококваліфікованих спеціалістів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Вострокнутов И. Е. Теория и технология оценки качества программных средств образовательного назначения / И. Е. Вострокнутов. – М. : Госкоорцентр информационных технологий, 2005. – 300 с.
2. Ковальчук Л. Я. Впровадження новітніх методик і систем навчального процесу в Тернопільському державному медичному університеті імені І. Я. Горбачевського / Л. Я. Ковальчук // Мед. освіта. – 2009. – № 2. – С. 10–14.
3. Роберт И. В. Теория и методика информатизации образования (психологопедагогический и технологический аспекты) [Текст] / И. В. Роберт. – 2-е изд., доп. – М. : ИИО РАО, 2008. – 274 с.

4. Семестрові комплексні тестові іспити – надійний критерій оцінки знань студентів / І. Р. Мисула, В. П. Марценюк, К. О. Пашко, О. О. Стаханська // Мед. освіта. – 2010. – № 1. – С. 16–37.
5. Schuwirth L. W. T. Clinical review. ABC of learning and teaching in medicine. Written assessment / L. W. T. Schuwirth; C. P. M. van der Vleuten // British Medical Journal. – 2003. – № 326. – P. 643–645.
6. The quality of in-house examination / R. F. Jozefowicz, B. M. Koeppen, S. Case [et al.] // Acad. Med. – 2002. – № 77. – P. 156–161.

АНАЛИЗ ОБЪЕКТИВНОСТИ НОВЕЙШИХ МЕТОДИК ОЦЕНИВАНИЯ ПРИ ПРЕПОДАВАНИИ БИОЛОГИЧЕСКОЙ И БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Резюме

В статье раскрыт опыт внедрения новейших методик оценивания при преподавании биологической и биоорганической химии в Тернопольском государственном медицинском университете имени И. Я. Горбачевского, обосновано объективность комплексного семестрового тестового экзамена по результатам оценки модулей дисциплины.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: инновационные методики, биологическая и биоорганическая химия, независимое тестирование.

V. P. Martsenyuk, P. R. Selskyi
I. YA. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

THE OBJECTIVITY ANALYSIS OF INNOVATIVE ASSESSMENT METHODS IN TEACHING BIOLOGICAL AND BIOORGANIC CHEMISTRY

Summary

The article deals with an experience in innovative assessment methods, implementing while teaching biological and bioorganic chemistry in I.Ya. Horbachevsky Ternopil State Medical University. According to the evaluation results of the subject modules, the objectivity of complex semester test exam has been substantiated.

KEY WORDS: innovative methods, biological and bioorganic chemistry, independent assessment.

Отримано 11.07.12

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

ОТРУЄННЯ ТЕТРАХЛОРМЕТАНОМ: ПОШИРЕНІСТЬ, ПАТОГЕНЕЗ, КЛІНІЧНІ ТА МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ПРОЯВИ

У статті проведено аналіз наявних літературних даних щодо поширеності інтоксикацій тетрахлорметаном на сучасному етапі, його впливу на організм та механізмів токсичності. Показано, що тетрахлорметан володіє вираженим токсичним впливом на організм у цілому та на шлунково-кишковий тракт зокрема. Доведено актуальність вивчення патофізіологічних, біохімічних та морфофункціональних змін при отруєнні тетрахлорметаном.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **токсичність, тетрахлорметан, шлунково-кишковий тракт**

Масштаби сучасних техногенних забруднень внаслідок діяльності людини сьогодні переважають над потенціалом біосферної екосистеми і створюють реальну загрозу для життя людини і тварин [18]. Це зумовлено тим, що щорічно на Землі синтезуються десятки тисяч нових сполук, значна частина яких (близько 2000) знаходить широке застосування у виробництві [26]. Україна також належить до держав зі значним індустріальним потенціалом, а відповідно, і техногенним навантаженням на довкілля. Так, щорічно промислові підприємства викидають в атмосферу понад 100 млн тонн токсичних хімічних сполук, у водоймища потрапляє до 2,5 млрд кубічних метрів забруднених стічних вод [13]. Прогресуюче насичення виробничого і позавиробничого середовища потенційно небезпечними токсичними речовинами, механізм впливу яких на організм людини у загальних рисах виступає як токсичний дисгомеостаз, зумовлює поширення екзохімічної патології, яка, у свою чергу, призводить до збільшення частоти загальної захворюваності й смертності населення [11, 14, 19].

За даними експертів ВООЗ, здоров'я населення залежить від стану навколишнього середовища в середньому на 18–20 %. Проте, за іншими оцінками [26], до погіршення стану здоров'я населення призводить техногенне забруднення повітря на 43–45 %. Неприятливі умови довкілля спричиняють в основному підвищення рівня серцево-судинних хвороб, бронхіальної астми, цукрового діабету, алергічних хвороб, захворювань шлунково-кишко-

вого тракту та ін. [1]. Крім того, вважають, що понад 90 % пухлин у людини після 50 років мають метаболічне походження і викликані хімічним забрудненням організму [5].

Однією з небезпечних хімічних речовин, що зумовлюють негативний вплив на довкілля і безпосередньо на саму людину є чотирихлористий вуглець (CCl_4 , тетрахлорметан, ТХМ, перхлорметан), що належить до хлорпохідних метану і є безколірною рідиною з ароматичним запахом [8, 23, 28].

Метою даної роботи було узагальнити дані літератури стосовно поширеності отруєнь тетрахлорметаном та механізмів його токсичної дії.

Виробництво ТХМ розпочалось у 1907 р. в США, де його найчастіше отримували шляхом хлорування метану, метанолу або пропану. В 80-х роках світове виробництво чотирихлористого вуглецю сягнуло рівня 850–960 кілотонн. Більшу частину виробленого чотирихлористого вуглецю використовували в продукції хлорфторвуглеводнів, які в основному застосовували як холодоагенти, паливо, піноутворюючі засоби і розчинники та у виробництві інших хлорованих вуглеводнів. Крім того, чотирихлористий вуглець може утворюватися як побічний продукт при виробництві інших речовин і при відбілюванні целюлози деревини. В 1989 р. лише у США 2000 тонн CCl_4 надійшло в атмосферу [25, 28].

На сьогодні ТХМ широко використовують у промисловості як розчинник масел, жирів, каучуку, смол; для екстрагування жирів і алкалоїдів з кісток та насіння; при виробництві фреонів; для чищення і знежирення одягу в

побути й виробничих умовах; як зерновий фумігант, пестицид, знежирювач для металу, піноутворюючий засіб у вогнегасниках, а також у виробництві фарби, пластмаси, напівпровідників і домішок до бензину [2, 3, 30].

В медичній практиці ТХМ раніше використовували як антигельмінтний засіб. Він ефективний при зараженні анкілостомами, аскаридами, гостриками тощо [2]. На сучасному етапі ТХМ виключено з номенклатури лікарських засобів у зв'язку з тим, що з'явилися більш безпечні препарати, що володіють вищою антигельмінтною активністю [9].

ТХМ вивільняється в навколишнє середовище в основному шляхом прямого надходження в атмосферу, в меншій кількості – у ґрунт і воду. Оцінка періоду життя ТХМ в атмосфері (загальне перебування тетрахлорметану в тропосфері й стратосфері в сукупності) є варіабельною, але більшість значень перебуває в діапазоні від 25 до 100 років [2, 30].

У ґрунті чотирихлористий вуглець володіє високою мобільністю і надходить у ґрунтові води. Частка ТХМ у ґрунті може адсорбуватися органічними речовинами ґрунту, адсорбція тетрахлорметану буде залежати від складу органічних речовин ґрунту і вмісту води в ґрунті [24].

В останні роки частота гострих інтоксикацій хлорованими вуглеводнями, зокрема ТХМ, і показник смертельних випадків від отруєнь не зменшуються [3, 29]. Незважаючи на відносно невелику частоту гострих інтоксикацій даними сполуками (до 5 %), вони характеризуються дуже високою смертністю отруєних (до 96 %) [20]. Пацієнти, отруєні ТХМ, складають до 60 % всіх хворих із токсичним ураженням печінки [7]. Найбільш типовими є інгаляційний та пероральний шляхи надходження хлорованих вуглеводнів. Особливо небезпечним ТХМ може бути при аварійних ситуаціях на хімічних об'єктах, зокрема в процесі знищення хімічної зброї, коли через його високу летючість інгаляційним отруєнням може піддаватися велика кількість людей. Дуже небезпечна робота без засобів захисту в замкнених, погано вентильованих приміщеннях, при чищенні ємностей, цистерн, баків, де накопичуються випари хлорованих вуглеводнів. Продукти термічної деструкції ТХМ утворюють разом із численними токсикантами отруйну речовину фосген. Іноді зустрічаються випадки вдихання випарів ТХМ з метою сп'яніння [3].

Інгаляційний шлях ураження ТХМ зафіксовано у Франції в 1938 р. [30]. Часто спостерігаються отруєння на малих підприємствах, при дегельмінтизації тварин. Причиною пер-

оральних отруєнь часто є приймання ТХМ з метою сп'яніння як сурогату алкоголю або із суїцидальною метою. Можливі отруєння при тривалому контакті ТХМ зі шкірою. Масове отруєння з 20-ма смертельними випадками описано при прийманні всередину засобу для миття волосся, що містив 1,4 % ТХМ (решта спирт) [2].

Смертельна концентрація ТХМ для людини дорівнює 50 мг/л при вдиханні протягом 1 год (або прийманні всередину 20–30 мл токсиканту). Для появи симптомів отруєння достатньо прийняття всередину 2–4 мл токсиканту. Етиловий спирт посилює токсичну дію ТХМ [2].

ТХМ легко всмоктується через шлунково-кишковий та респіраторний тракти у людей і тварин. Немає даних щодо розподілу ТХМ в організмі людини. Дослідження на тваринах показують, що найбільша частка поглиненої дози ТХМ накопичується у тканинах з високим вмістом ліпідів, таких, як жирова тканина, печінка і кістковий мозок. При гострому отруєнні ТХМ уражаються центральна нервова система, шлунково-кишковий тракт, печінка, нирки, згортальна система крові, серцево-судинна і дихальна системи. При дії на шкіру ТХМ викликає дерматити, іноді екзему, кропивницю [28].

Відомо, що ТХМ – одна з найсильніших гепатотропних отрут, що призводять до деструктивних змін паренхіми печінки. Поряд із цитотоксичним ефектом, отрута може підвищувати рівень апоптотичного ураження клітин [10].

Завдяки вираженій ліпотропності ТХМ швидко всмоктується в кров. В експериментах на тваринах найбільша концентрація отрути спостерігається в жировій тканині (приблизно в 8 разів вища, ніж у крові). Найбільша концентрація ТХМ у крові досягається протягом 2–4 год, а через 6 год його велика частина переходить у жирову тканину, печінку, мозок. При інгаляційних отруєннях токсикокінетичні процеси перебігають у 2–3 рази швидше. В організмі ТХМ частково дуже повільно руйнується. Виділяється протягом тривалого часу (до 70 днів) через дихальні шляхи, у незміненому вигляді (до 50–60 %) – через нирки і кишечник. У нирках не концентрується [25, 28].

У клінічній картині інгаляційних отруєнь ТХМ можна виділити декілька періодів: початковий, відносного поліпшення, або прихований період, період виражених симптомів інтоксикації, який ще часто називають періодом печінково-ниркової недостатності, періоди відновлення і наслідків.

Початковий період характеризується наркотичною дією отрути. Постраждалі відчувають

запах тетрахлорметану та солодкуватий смак у роті, в них можуть виникати явища нерізного подразнення верхніх дихальних шляхів. Інтенсивність наркотичної дії залежить від концентрації чотирихлористого вуглецю в повітрі й варіює від легких астеничних явищ (слабкість, запаморочення, головний біль, стан, що нагадує сп'яніння) до значних психічних порушень, сопопу і глибокої коми.

При тривалих інгаляціях низьких концентрацій чотирихлористого вуглецю наркотична дія виражена слабо. Постраждали протягом декількох годин (іноді до доби) можуть почувати себе цілком задовільно. Картина інтоксикації проявляється подразненням глотки (біль при ковтанні, дертя в горлі), ознобом, м'язовим болем, субфебрильною температурою тіла, її часто сприймають як ГРВІ, ангіну, а при появі блювання, болю в животі, попереку – як харчову токсикоінфекцію. Діагноз зазвичай прояснюється після приєднання ознак гепатонефропатії, яка, незважаючи на відносно легкі початкові прояви інтоксикації, може перебігати в важкій формі. При інгаляції високих концентрацій тетрахлорметану наркотичний стан може тривати декілька годин. На цьому тлі розвиваються гостра серцево-судинна недостатність, важкі розлади дихання з паралічем дихального центру або механічною асфіксією. Глибина коми поступово зменшується. В цей час може виникати різке психомоторне збудження, що є поганою прогностичною ознакою.

Поступово повертається свідомість, і настає період відносного поліпшення. Турбують помірна слабкість, розбитість, головний біль, можливі блювання, послаблення випорожнень.

До кінця 1-ї–на 2-гу добу стан хворого знову погіршується і розвивається період інтоксикації. З'являються або посилюються біль у животі, нудота, блювання, гикавка, пронос. Підвищується температура тіла. Виникає геморагічний діатез. На 2–5 доби виникають виражені симптоми ураження печінки (біль у правому підребер'ї, іктеричність, знебарвлення калових мас, збільшення розмірів органа) і нирок (спрага, біль у попереку, набряки, олігоанурія, підвищення артеріального тиску та ін.) Причому спочатку домінує гепатаргія, потім – уремія. Основна причина смерті пацієнтів – гостра печінково-ниркова недостатність і її ускладнення (масивні кровотечі, пневмонія) [6, 16].

Тетрахлорметан піддається метаболічному розпаду в мембранах ендоплазматичного ретикулума печінки, нирок, легень та інших тканинах з участю цитохром Р-450-залежних

монооксигеназ. У результаті утворюються вільні радикали (CCl_3^+ ; O-O-CCl ; HO-OCCCl_3 ; HO-CCl_3), з яких високою біологічною активністю володіє CCl_3^+ . Вільні радикали впливають на функціональні групи білків внутрішньоклітинних мембран і ферментів, модифікують гемову структуру цитохрому Р-450, ініціюють реакції пероксидного окиснення ненасичених жирних кислот у мембранах, інгібують біосинтез білка, зумовлюють дисоціацію полісом, рибосом, руйнування РНК.

Трансформація тетрахлорметану в мікросомах може проходити за гетеролітичним (іонним) і гомолітичним (вільнорадикальним) типами. За умов гетеролітичного розпаду, внаслідок переходу електронної пари до електронегативного атома хлору, генеруються іони CCl_3^+ і Cl^- , при гомолітичному – утворюються трихлорметильний радикал ($\text{CCl}_3^\cdot$) та атом хлору [4].

Розчиняючись у мембранах мікросом, CCl_4 зв'язується з цитохромом Р-450, що має вирішальне значення для подальшого метаболізму цієї отрути, оскільки саме двовалентне залізо гему цитохрому Р-450 може віддавати електрони, необхідні для гомолітичного розпаду молекули тетрахлорметану. Існує чимало даних, що першим кроком у біотрансформації чотирихлористого вуглецю є відновлювальне дегалогенування – відновне розщеплення одного зв'язку вуглець–хлор для отримання іонів хлору і трихлорметил радикала. Відновлювальне дегалогенування тетрахлорметану здійснюється, як вважає більшість дослідників, однією з ізоформ цитохрому Р-450 – CYP2E1 [4, 28]. Перша реакція каталізується нікотинамідаденіндинуклеотидфосфатзалежною CYP450, що є індукцибельною (рис.). Подальший шлях метаболізму трихлорметил радикала залежить від наявності кисню. В анаеробних умовах трихлорметил радикал може димеризуватися з утворенням гексахлоретану, який було виявлено в тканинах тварин. Додавання протона й електрона до трихлорметил радикала зумовлює утворення хлороформу (CHCl_3), який виявлено в піддослідних щурів і кроликів. Трихлорметил радикал може зазнавати подальшого відновлювального дегалогенування, що каталізується CYP450 з формуванням дихлоркарбону ($:\text{CCl}_2$), який може незворотно зв'язуватися з компонентами тканин або вступати в реакцію з водою з утворенням формілхлориду (HCOCl), що розкладається до окису вуглецю. Крім того, трихлорметил радикал може безпосередньо зв'язуватися з мікросомальними ліпідами і білками. В аеробних умовах трихлорметил радикал може бути

перехоплений киснем, утворюючи трихлорметил пероксид радикал, який може зв'язуватися з тканинними білками або розкладатися з утворенням фосгену (COCl_2) і електрофільної форми хлору.

Трихлорметил пероксид радикал є основним ініціатором пероксидного окиснення ліпідів, яке відбувається в результаті впливу чотирихлористого вуглецю. Трихлорметил пероксид радикал може атакувати поліненасичені жирні кислоти в клітинних мембранах, утворюючи вільні радикали жирних кислот, що, у свою чергу, запускають ланцюгову реакцію пероксидного окиснення. "Мембранний дефект" призводить до різкого порушення проникності в субклітинних утворах – мітосомах, мітохондріях, лізосомах з накопиченням у них іонів Ca^{2+} . При пошкодженні лізосом у цитоплазму надходять потужні протеолітичні ферменти, що збільшують пошкодження. Відбуваються тяжкі порушення метаболізму вуглеводів, білків та жирів. Накопичення нейтральних ліпідів у цитоплазмі клітин викликає їх жирову дистрофію [16, 17, 28].

Вуглекислий газ формується шляхом гідролітичного розщеплення фосгену. Фосген також може зв'язуватися з відновленим глутатіоном (GSH) із формуванням диглутатіонілу дитіокарбонату або з цистеїном із форму-

ванням оксотіазолідину карбонової кислоти. Метаболізму піддається 20 % від введеної дози TXM [28].

Проте існують особливості вмісту та функціональної активності мітосомальних монооксигеназ і цитохрому P-450 залежно від віку тварин [4]. За даними деяких дослідників [28], максимальний вміст цитохрому P-450 спостерігався у молодих щурів, поступово до 6-місячного віку тварин цей показник знижувався і залишався на такому самому рівні до старості (18–24 місяці)

R. C. Zangar et al. [22] виміряли метаболічні константи швидкості для чотирихлористого вуглецю у людських і тваринних печінкових мітосомальних препаратах *in vitro*. Результати показали, що швидкість обміну тетрахлорметану в організмі людини ($K_m = 56,8$) більше схожа на швидкість обміну в щурів ($K_m = 59,1$), ніж в інших видів гризунів. LD_{50} для TXM у щурів при оральному надходженні становить близько 8 г/кг.

Фактори, що підвищують експресію CYP2E1, підвищують і чутливість до CCl_4 , тому що відносно пришвидшення метаболізму значно посилює генерацію трихлорметил радикалів у печінці та нирках. До таких факторів належать етанол, ізопропанол, метанол, 2-бутанол та інші аліфатичні спирти, ацетон, фенобарбітал тощо. До того ж, існують дані про зменшення гепатотоксичності CCl_4 , асоційоване зі зниженням біоактивності ксенобіотика. Сумісне введення TXM та сірковуглецю (CS_2) щурам зумовило печінкові та неврологічні прояви, асоційовані із CS_2 , але не з ефектами, що характерні для TXM. Дослідники пояснюють цей результат руйнуванням CYP2E1 сірковуглецем та зменшенням біоактивності TXM. Попереднє введення нітрату свинцю знизило гепатотоксичність TXM, імовірно, внаслідок здатності свинцю інгібувати цитохром P-450 [27, 28].

При патоморфологічному дослідженні виявляють тяжкі пошкодження печінки у вигляді масивних централобулярних некрозів і пігментного цирозу, при інгаляційному отруєнні некротичні зміни менш виражені. Вважають, що зміни в печінці максимальні в ранні терміни отруєння. Зміни в нирках проявляються картиною нефрозу, гідропічною дистрофією епітелію звивистих каналців. Характерні множинні крововиливи під епікардом, ендокардом, плеврою, слизовою оболонкою шлунково-кишкового тракту. В разі швидкої смерті на аутопсії відмічають лише крововиливи і набряк мозку. При гістологічному дослідженні виявляють ознаки енцефаломієліту, дегенеративні

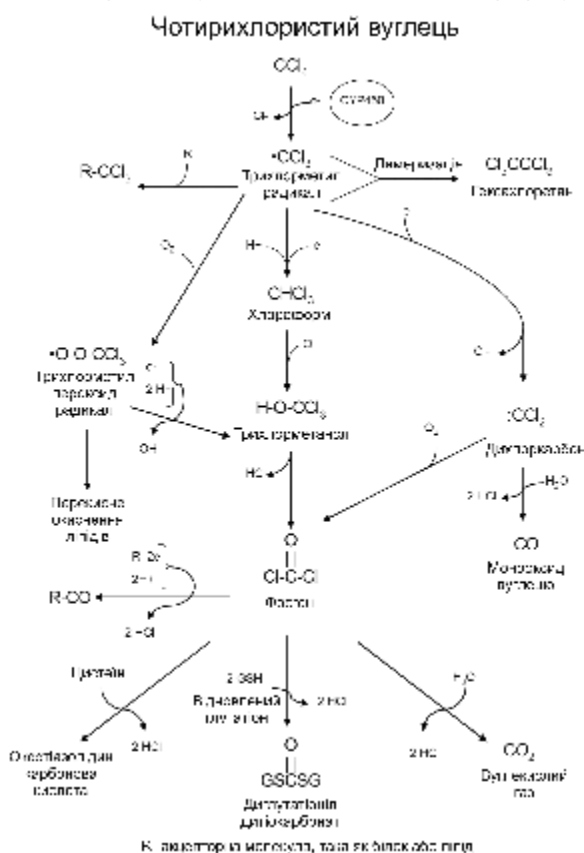


Рис. Схема метаболізму тетрахлорметану.

зміни нервових клітин, периферичні неврити, неврит зорового нерва, крововиливи, жирову емболію мозку [2, 12, 15, 21].

Таким чином, враховуючи досить широке розповсюдження і використання в промисловості, техніці й побуті ТХМ та високу летальність

при отруєнні, слід зробити висновок, що проблема вивчення патофізіологічних, біохімічних та морфофункціональних змін при гострому отруєнні ТХМ є важливою як у теоретичному, так і в практичному відношенні.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Волошин І. Техногенні поллютанти та їхній вплив на поширення захворювань у Волинській обл. / І. Волошин, І. Мезенцева // Вісник Львівського університету. Серія географічна. – 2007. – № 34. – С. 37–44.
2. Забродский П. Ф. Иммунопатология при отравлениях ядовитыми техническими жидкостями. Фармакологическая коррекция / П. Ф. Забродский, В. Г. Лим. – Саратов, 2012. – 341 с.
3. Забродский П. Ф. Иммунотоксикология ксенобиотиков / П. Ф. Забродский, В. Г. Мандыч. – Саратов : Изд-во СВИБХБ, 2007. – 420 с.
4. Кліщ І. М. Особливості перебігу окисно-відновних процесів у печінці щурів різного віку за токсичного ураження тетрахлоретаном / І. М. Кліщ // Укр. біохім. журн. – 1998. – **70**, № 6. – С. 106–110.
5. Ксенобиотики. Основные закономерности взаимодействия с ион-транспортными системами плазматической мембраны растительной клетки. Оценка их биобезопасности / В. М. Юрин, А. П. Кудряшов, Т. И. Дитченко [и др.] // Труды Белорусского государственного университета. Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. – 2007. – Вып. 1. – С. 3–15.
6. Курляндский Б. А. Общая токсикология / Б. А. Курляндский, В. А. Филлов. – М. : Медицина, 2002. – 608 с.
7. Лим В. Г. Нарушение неспецифической резистентности организма и иммунного статуса при острых отравлениях спиртами и хлорированными углеводородами и их коррекция : автореф. дисс. на соискание уч. степени д-ра мед. наук / В. Г. Лим. – Саратов, 2006. – 35 с.
8. Ляхович Р. М. Вплив комбінованого застосування тіотриазоліну та внутрішньошлункової оксигенації на перебіг гострого тетрахлорметанового гепатиту / Р. М. Ляхович, В. В. Гнатів, А. А. Гудима // Актуальные проблемы транспортной медицины. – 2011. – № 1 (23). – С. 135–138.
9. Машковский М. Д. Лекарственные средства. – 16-е изд., перераб., испр. и доп. – М. : Новая волна : Издатель Умеренков, 2010. – 1216 с.
10. Механізми токсичної дії (некроз, апоптоз) хлоралканів на фракції ядерного хроматину клітин печінки і тетрахлорметан / Ю. І. Губський, Є. Л. Левицький, Г. Г. Горюшко [та ін.] // Современные проблемы токсикологии. – 2008. – № 2. – С. 8–16.
11. Моисеенко Т. И. Антропогенно-индуцированные процессы в биосфере / Т. И. Моисеенко // Вестник Российской академии наук : Научный и общественно-политический журнал. – 2011. – **81**, № 12. – С. 1100–1108.
12. Морфометрия митохондриального аппарата гепатоцитов нормальной и цирротически измененной печени крыс / Н. Н. Безбородкина, С. В. Оковитый, Н. В. Кудрявцева [и др.] // Цитология. – 2008. – **50**, № 3. – С. 228–236.
13. Мудрый И. В. Тяжелые металлы в окружающей среде и их влияние на организм (обзор литературы) / И. В. Мудрый, Т. К. Короленко // Лік. справа. – 2002. – № 5–6. – С. 6–10.
14. Никитюк А. Моніторинг ґрунтів за вмістом органічних ксенобіотиків / А. Никитюк, А. Ліщук // Тваринництво України. – 2010. – № 6. – С. 2–6.
15. Олещук О. М. Зміни морфофункціонального стану печінки щурів при гострій інтоксикації тетрахлорметаном на фоні введення L-аргініну і глутаргіну / О. М. Олещук, Т. В. Дацко // Світ медицини та біології. – 2007. – № 3. – С. 24–28.
16. Отравления техническими жидкостями www.neurotoxicology.fatal.ru/doc/VPT_TECH_FLUIDS.doc
17. Смольякова В. И. Антиоксидантные эффекты тиофана при экспериментальном поражении печени тетрахлорметаном / В. И. Смольякова // Бюл. сиб. мед. – 2010. – № 5. – С. 98–101.
18. Цудзевич Б. О. Біохімічні аспекти метаболізму ксенобіотиків в організмі / Б. О. Цудзевич, І. В. Калінін // Агроекологічний журнал. – 2011. – № 3. – С. 81–86.
19. Штабський Б. М. Ксенобіотики, гомеостаз і хімічна безпека людини / Б. М. Штабський, М. Р. Гжегоцький. – Львів : Наутікус, 1999. – 306 с.
20. Эффективность гемосорбции на синтетических сорбентах при отравлении 1,2-дихлорэтаном / А. Н. Елькин, Д. П. Елизаров, В. А. Даванков, С. С. Катаев // Токсикол. вестн. – 2004. – № 2. – С. 6–8.
21. ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). (2005) Toxicological profile for carbon tetrachloride. Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA. PB2006-100002. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles>
22. Cytochrome P450 2E1 is the primary enzyme responsible for low-dose carbon tetrachloride metabolism in human liver microsomes / R. C. Zangar, J. M. Benson V. L. Burnett [et al.] // Chem. Biol. Interact. – 2000. – **125**. – P. 233–243.
23. Eastmond D. A. Evaluating genotoxicity data to identify a mode of action and its application in estimating cancer risk at low doses: a case study involving carbon

tetrachloride / D. A. Eastmond // Environ Mol Mut. – 2008. – **49**. – P. 132 – 141.

24. Fan Anna M. Public Health Goal for carbon tetrachloride in drinking water / Anna M. Fan, George V. Alexeeff. – 2000. – 39 p.

25. J. de Fouw Carbon tetrachloride World Health Organization Geneva, 1999 – 199 p.

26. Marquita K. Hill Understanding Environmental Pollution // Cambridge University Press 2004. – 455 p.

27. NTP (National Toxicology Program). (2007) National toxicology database search application. Standard toxicology & carcinogenesis Studies. Search results for

carbon tetrachloride (CAS No. 56-23-5). Available online at http://ntp-apps.niehs.nih.gov/ntp_tox/index.cfm

28. Rieth S. Toxicological review of carbon tetrachloride / S. Rieth, R. Sams Washington, DC 2010. – 473 p.

29. Rusinski P. Acute poisoning with selected hepatotoxic agents: biochemistry of toxic effect, clinical symptoms and treatment / P. Rusinski, Z. Kolasinski // Przegl. Lek. – 2003. – **60**, № 4. – P. 210–217.

30. Wernke M. J. Solvents and malignancy / M. J. Wernke, J. D. Schell // Clin. Occup. Environ. Med. – 2004. – **4**. – № 3. – P. 513–527.

А. В. Мизь

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

ОТРАВЛЕНИЕ ТЕТРАХЛОРМЕТАНОМ: РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ, ПАТОГЕНЕЗ, КЛИНИЧЕСКИЕ И МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПРОЯВЛЕНИЯ

Резюме

В статье проведен анализ имеющихся литературных данных о распространенности интоксикаций тетрахлорметаном на современном этапе, его воздействии на организм и механизмах токсичности. Показано, что тетрахлорметан обладает выраженным токсическим действием на организм в целом и на желудочно-кишечный тракт в частности. Доказана актуальность изучения патофизиологических, биохимических и морфофункциональных изменений при отравлении тетрахлорметаном.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: токсичность, тетрахлорметан, желудочно-кишечный тракт.

A. V. Miz

I. YA. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

POISONING OF CARBON TETRACHLORIDE: PREVALENCE, PATHOGENESIS, CLINICAL AND MORPHOFUNCTIONAL MANIFESTATIONS

Summary

The article analyzes the available literature data on the prevalence of carbon tetrachloride intoxication at the present stage, its impact on the body and mechanisms of toxicity. It was shown that carbon tetrachloride has a pronounced toxic effect on the body as a whole and the gastrointestinal tract in particular. We proved the relevance of the study of pathophysiological, biochemical and morphological changes during carbon tetrachloride poisoning.

KEY WORDS: toxicity, carbon tetrachloride, gastro-intestinal tract.

Отримано 02.08.12

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

БІОЛОГІЧНО АКТИВНІ РЕЧОВИНИ ВИДІВ РОДУ *HYPERICUM* L.

Роботу присвячено огляду літературних джерел, що стосуються характеристики деяких біологічно активних речовин видів роду *Hypericum* L., які поширені в Україні. Наведено відомості про фізіологічну дію цих речовин на організм людини і тварин.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: рід *Hypericum* L., флавоноїди, антраценпохідні, ксантони, ефірні олії, фізіологічна дія.

Серед лікарських рослин, які протягом багатьох століть широко застосовують у медичній практиці, чільне місце займають види роду Звіробій (*Hypericum* L.) [1, 9, 29]. В Україні цей рід нараховує 12 видів (*H. perforatum* L., *H. tetrapterum* Fries, *H. elegans* Steph ex. Willd., *H. maculatum* Crantz, *H. calycinum* L., *H. hirsutum* L., *H. humifusum* L., *H. linarioides* Bosse, *H. hyssopifolium* Chaix, *H. chrysothyrsum* (Woronow) Grossh., *H. montanum* L., *H. alpinum* Kit.) [16]. Проте лікарське значення мають лише *H. perforatum* та *H. maculatum*, які занесено до Фармакопей багатьох країн світу, в тому числі й України [4]. Згідно з внутрішньородовою класифікацією, розробленою англійським вченим Н. Робсоном (1977), ці два види належать до секції *Hypericum* L., яка є найбільш типовою серед секцій роду Звіробій [10, 12]. Рослини даних видів використовуються офіційною медициною для промислового виготовлення фармацевтичних препаратів різнобічної дії в Україні та країнах СНД [12]. Лікарською сировиною вважають траву звіробою разом із суцвіттями, зібраними на початку цвітіння у фазу бутонізації, оскільки в цей період надземна частина містить найбільшу кількість біологічно активних речовин (БАР) [20]. Саме вони зумовлюють лікувальні властивості рослини, що проявляються у спазмолітичній, в'язучій, сечогінній, седативній, ранозагоювальній, протизапальній, бактеріостатичній, фармакологічній діях на організм людини [8].

Серед широкого спектра БАР, що синтезуються в надземних органах рослин роду *Hypericum* L., розрізняють флавоноїди, похідні антрацену, ксантони, ефірні олії, дубильні

речовини, фенолкарбонові кислоти, смоли, алкалоїди, вітаміни тощо [1, 5, 13, 26, 27].

Флавоноїди рослин роду *Hypericum* представлені переважно флавонолами (гіперозид – 0,3–0,7 %, а також рутин, кверцетин та мірицетин), антоціанінами, лейкоантоціанідинами, ізольованими біфлавоноїдами (аментофлавіон – 0,01–0,05 % та біапигенін – 0,1–0,5 %) тощо [5, 27]. Кількісний вміст флавоноїдів у рослинах цього роду складає 5–6 % від усіх БАР і змінюється залежно від фази вегетації [5]. Максимальна кількість даних речовин спостерігається під час цвітіння. Так, за даними О. Ю. Маковецької (1999), у *H. calycinum* (секція *Ascyreia*) кількісний вміст флавоноїдів у перерахунку на кверцетин у вегетативну фазу складає 8,13 %, під час цвітіння – 9,35 %, на кінець вегетації – 8,46 % [11].

Прояви біологічної активності флавоноїдів дуже різноманітні [2]. Так, у 1947 р. Дж. Гріффін встановив радіопротекторну дію флавоноїдів. Він показав, що підшкірне введення рутину покращувало ефективність лікування променевого геморагічного синдрому, спричиненого радоновими препаратами (20–40 мкюри) [2]. Також фенольні сполуки – рутин і катехіни – чинять судинозміцнювальний вплив [17], інгібуючи активність гіалуронідази [2]. Флавоноїди впливають на ферментні системи, імунні та обмінні процеси, викликають гіполіпідемічний, гіпоглікемічний і гіпоазотемічний ефекти. Флавоноїди відомі як ефективні гепатопротектори, впливають на секреторну та дезінтоксикаційну функції печінки, стимулюють секрецію жовчі, виявляють холеретичну активність [2]. Вони ущільнюють мембрани, попереджують накопичення в тканинах вільних радикалів, здатні

© О. С. Коваль, Л. В. Фтемова, Н. М. Дробик, 2012.

утворювати комплекси з іонами металів зі змінною валентністю. Завдяки цьому їх успішно застосовують як антидоти при отруєнні важкими металами та як радіопротектори. Флавоноїди поліпшують моторику, секреторну та всмоктувальну функції травного каналу, мають антисклеротичний, протипухлинний, антиоксидантний вплив, окремі з них проявляють в'язучу дію [2].

Антраценпохідні. Характерними представниками цього класу БАР для рослин роду *Hypericum* є гіперичин (рис. 1, А), псевдогіперичин (кількісно в 2–4 рази перевищує вміст гіперичину) [24, 27] (рис. 1, Б), протогіперичин, протопсевдогіперичин, похідні емодину та відновлених форм антрахінонів [1, 10, 12, 13, 15]. Сума похідних антрацену змінюється протягом усього періоду вегетації, досягаючи максимуму під час фази цвітіння [11, 12, 24]. За даними О. Ю. Маковецької (1999), у *H. calycinum* (секція *Ascyreia* Choisy) кількісний вміст антраценпохідних у перерахунку на емодин у вегетативну фазу складає 0,16 %, під час цвітіння – 0,29 %, на кінець вегетації – 0,20 % [11].

Для отримання антраценпохідних, крім дикорослих рослин *H. perforatum*, використовують також культуру тканин і органів *in vitro*. При цьому показано, що вміст гіперичину відрізняється в різних культурах. Зокрема, мінімальну кількість гіперичину виявлено у калюсній культурі стеблового походження, тоді як у проростках та рослинах *in vitro* значення цього показника відповідало такому в рослинах з природних популяцій [28]. Такі відмінності, на думку дослідників, зумовлені тим, що біосинтез

гіперичину пов'язаний зі ступенем утворення та диференціації темних залозистих структур, розташованих по краях листків і пелюсток [22, 23, 28].

Цікавою особливістю діантронів (конденсованих димерних похідних антрацену) є їх обмежена розчинність у воді (при кімнатній температурі й фізіологічному рН) та органічних розчинниках. Проте при підвищенні температури їх розчинність у воді збільшується, що й використовують у медицині при приготуванні чаїв із трави звіробою [27].

Для похідних антрацену характерний широкий спектр біологічної активності. Зокрема, встановлено протівірусну активність гіперичину та псевдогіперичину [24], які можуть без перешкод проникати через цитоплазматичну мембрану інфікованих клітин, порушуючи збирання та дозрівання інтактних віріонів на цитоплазматичних мембранах [1, 24]. Крім цього, гіперичин селективно поглинається клітинами злоякісних утворів, що призводить до їх руйнування за умов опромінення світлом видимого діапазону [18], що підтверджує фотодинамічну дію даної речовини [1]. Низька цитотоксичність гіперичину та псевдогіперичину сприяє антидепресивній та імуностимулюючій діям препаратів зі звіробою [14, 28]. Також похідні антрацену відомі своїми антиоксидантними та проносними властивостями [9].

Ксантони. Для рослин роду *Hypericum* характерна наявність групи власне ксантонів та ксантолїгноїдів. Власне ксантони у звіробійних зустрічаються в моно-, ди-, три-, тетра-, пента- та гексазаміщеннях [3, 5]. Ксантолїгноїди у роду *Hypericum* представлені такими речовинами, як кількорин (0,01 %) (корені *H. maculatum* та *H. perforatum*) (рис. 2), а також рідкісний ксантолїгноїд гадензин (*Vismia guaramiranga*) [5, 27]. Так, при дослідженнях надземної частини *H. calycinum* на наявність речовин ксантонової природи було виділено дві нові речовини, які за структурою є 4,6-дигідрокси-1,3-диметоксиксантоном та 4,7-дигідрокси-2,5,6-триметоксиксантоном [6]. Крім цього, група німецьких учених при тестуванні проти-грибкової дії *H. perforatum* виділили такі два

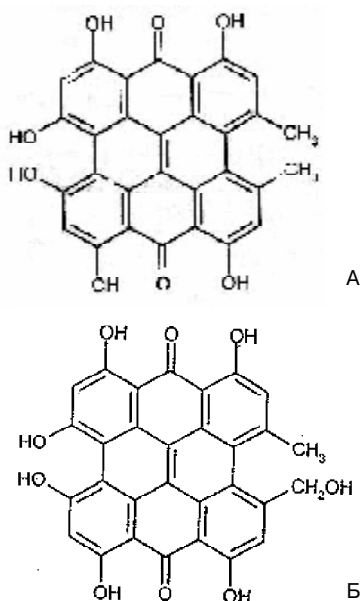


Рис. 1. Похідні антрацену: А – гіперичин, Б – псевдогіперичин.

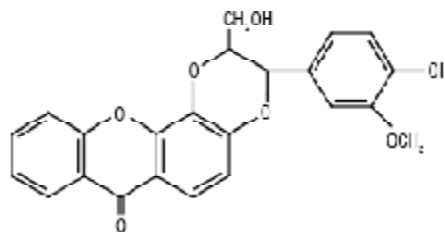


Рис. 2. Кількорин.

ксантони, як 4,6-дигідрокси-2,3-диметокси-ксантон та цис-кількорин [22].

Ксантони видів роду *Hypericum* проявляють антимікробну активність проти деяких штамів стафілококів та ентерококів, а також мають антидипресантну і протималярійну дії [1, 6, 25, 29]. Ксантони із заміщенням у положеннях 1,6 та 1,3 є інгібіторами саркоми, 1,3,8 – проявляють протигрибкову активність, 1,3,7,8 – мають протитуберкульозну дію, 1,3,5,8 – характеризуються антивірусними властивостями. Також деякі ксантони діють як нестероїдні протизапальні засоби [1, 5].

Ефірні олії видів цього роду представлені ациклічними монотерпенами (мірцен) і монотерпеновими спиртами [11], біциклічними монотерпенами типу пінану, що мають два конденсовані неароматичні кільця [1, 5, 7, 15], сесквітерпенами, з яких у максимальній кількості присутній каріофілен оксид [21], а також складними ефірами ізовалеріанової кислоти [1, 5, 7, 15]. Кількісний вміст ефірних олій у рослин роду *Hypericum* становить 0,1–0,25 % [1, 27]. За даними О. Ю. Маковецької (2001), основним компонентом ефірної олії *H. montanum* (секція *Adenosepalum*) є саме каріофілен. Також з ефірної олії цього виду вчений Б. Долежель виділив азулен, який теж є речовиною сесквітерпенової природи [1]. При вивченні якісного складу ефірних олій *H. perforatum* флори Башкортостану було ідентифіковано 85 компонентів [21], які в найбільшій кількості

локалізовані в зрілих коробочках, квітах та листках, у стеблах їх виявлено дуже мало [1].

Ефірні олії рослин роду *Hypericum* проявляють бактеріостатичну, антисептичну, проти-запальну, дезінфікуючу та фунгістатичну дії [1]. Крім цього, вони здатні слабше або сильніше подразнювати шкіру, впливати на секрецію бронхів, стимулюючи збільшення кількості секрету, що полегшує відкашлювання [5]. Проявляють сечогінну дію, що пов'язана з їх подразнювальним впливом на нирки; у малих дозах посилюють слиновиділення та секрецію шлунка, покращуючи травлення [5]. Широке застосування отримали азуленогенні лікарські препарати, які пришвидшують загоєння ран, сприяють ліквідації гнійних абсцесів, флегмон, карбункулів, фурункулів тощо [1]. Висока протизапальна активність азуленових сполук забезпечила їх використання як складових зубних паст, кремів та інших косметичних засобів [19].

Отже, біологічно активні речовини, що синтезуються в рослинах роду *Hypericum*, мають важливе фармацевтичне значення та широко застосовуються у медичній практиці. Особливий інтерес викликають такі групи речовин, як флавоноїди, похідні антрацену, ксантони, ефірні олії тощо. Та, незважаючи на деякий прогрес у їх вивченні за останні десятиріччя, окремі аспекти залишаються недостатньо з'ясованими, що спонукає до їх більш детального подальшого дослідження.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Айзенман Б. Е. Антимикробные препараты из зверобоя / Б. Е. Айзенман, Н. А. Дербенцева. – К. : Наук. думка, 1976. – 173 с.
2. Барабой В. А. Биологическое действие растительных фенольных соединений / В. А. Барабой. – К. : Наук. думка, 1976. – 260 с.
3. Гудвин Т. Введение в биохимию растений / Т. Гудвин, Э. Мерсер. – М. : Мир, 1986. – 312 с.
4. Державна Фармакопея України / Державне підприємство “Науково-експертний фармакопейний центр”. – 1-ше вид. – Доповнення 2. – Харків : РІРЕГ, 2008. – 620 с.
5. Ковальов В. М. Фармакогнозія з основами біохімії / В. М. Ковальов, О. І. Павлій, Т. І. Ісакова. – Харків : В-во НФАУ “МТК-книга”, 2004. – 703 с.
6. Коновалова О. Ю. Ксантони звіробоя чашечкового (*Hypericum calycinum* L.) / О. Ю. Коновалова // Фармац. журн. – 2007. – № 4. – С. 79–84.
7. Лавренова Г. А. Травы, дарующие здоровье / Г. А. Лавренова. – Донецк : Донецчина, 1994. – 446 с.
8. Лебедева Т. С. Пигменты растительного мира / Т. С. Лебедева, К. М. Сытник. – К. : Наук. думка, 1986. – 88 с.
9. Лікарські рослини : фітотерапевтичний довідник / [Олійник П. В., Бензель Л. В., Сетиня М. Л., Крамаренко Г. В.]. – К. : Рідний край, 1999. – 320 с.
10. Маковецька О. Ю. Біологічно активні речовини роду *Hypericum* L. як джерело створення лікарських засобів із заданими властивостями : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня д. фармац. наук / О. Ю. Маковецька. – Київ, 2002. – 56 с.
11. Маковецька О. Ю. Дослідження біологічно активних речовин видів роду звіробій *Hypericum* L. Повідомлення 1. Секція *Campylosporus* (Spach) R. Keller та *Psorophytum* (Spach) Nyman / О. Ю. Маковецька // Фармац. журн. – 1998. – № 5. – С. 38–44.
12. Маковецька О. Ю. Дослідження біологічно активних речовин видів роду звіробій *Hypericum* L. Повідомлення 2. Секція *Ascyrella* Choisy / О. Ю. Маковецька // Фармац. журн. – 1999. – № 1. – С. 47–52.
13. Маковецька О. Ю. Дослідження біологічно активних речовин видів роду звіробій *Hypericum* L. Повідомлення 5. Секція *Hypericum* / О. Ю. Маковецька // Фармац. журн. – 1999. – № 4. – С. 30–36.
14. Маковецька О. Ю. Дослідження біологічно активних речовин видів роду звіробій *Hypericum* L.

Повідомлення 11. Секції *Adenosepalum* Spach та *Elodes* (Adans.) W. Koch / О. Ю. Маковецька // Фармац. журн. – 2001. – № 4. – С. 50–55.

15. Мочалин В. Б. Успехи химии азулена / В. Б. Мочалин, Ю. Н. Поршнев // Успехи химии. – 1977. – № 6. – С. 1034.

16. Носаль І. М. Від рослини – до людини: Розповіді про лікувальні та лікарські рослини України / І. М. Носаль. – К. : Веселка, 1992. – 606 с.

17. Определитель высших растений Украины / [Доброчаева Д. Н., Котов М. И., Прокудин Ю. Н. и др.]. – [2 изд. стереот.]. – К. : Фитосоциоцентр, 1999. – 548 с.

18. Речовини фотодинамічної дії з рослин роду Звіробій та їх антивірусна активність. Повідомлення 1 / О. Ю. Маковецька, І. О. Бойко, Є. І. Капінус, А. П. Лебеда // Фармац. журн. – 1997. – № 3. – С. 19–24.

19. Речовини фотодинамічної дії з рослин роду Звіробій та їх антивірусна активність. Повідомлення 2 / О. Ю. Маковецька, І. О. Бойко, Є. І. Капінус, А. П. Лебеда // Фармац. журн. – 1997. – № 4. – С. 49–51.

20. Сафонов М. М. Повний атлас лікарських рослин / М. М. Сафонов. – Тернопіль : Навчальна книга – Богдан, 2008. – 384 с.

21. Файзуллина Р. Р. Фитохимическое изучение зверобоя продырявленного (*Hypericum perforatum* L.) флоры Башкортостана и перспективы создания на его основе новых лекарственных средств : автореф. дис. на соискание учен. степени канд. фарм. наук / Р. Р. Файзуллина. – Пермь, 2005. – 21 с.

22. Bioactive xanthenes from the roots of *Hypericum perforatum* (common St John's wort) / S. L. Crockett,

B. Poller, N. Tabanca [et al.] // J. Sci. Food Agric. – 2011. – № 3. – P. 91.

23. Crockett S. L. Taxonomy and chemotaxonomy of the genus *Hypericum* / S. L. Crockett, N. K. B. Robson // Medicinal Aromatic Plant Sci. Biotech. – 2011. – № 5(1). – P. 1–13.

24. Karioti A. Hypericins as potential leads for new therapeutics / A. Karioti, A. R. Bilia // Int. J. Mol. Sci. – 2010. – № 11. – P. 562–594.

25. Kraus G. A. Quinones as key intermediates in natural products synthesis. Syntheses of bioactive xanthenes from *Hypericum perforatum* / G. A. Kraus, J. Mengwasser // Molecules. – 2009. – № 14. – P. 2857–2861.

26. Nathan P. J. *Hypericum perforatum* (St John's Wort): a non-selective reuptake inhibitor? A review of the recent advances in its pharmacology / P. J. Nathan // J. Psychopharm. – 2001. – № 15(1). – P. 47–54.

27. Patocka J. The chemistry, pharmacology, and toxicology of the biologically active constituents of the herb *Hypericum perforatum* L. / J. Patocka // J. Appl. Biomed. – 2003. – №1. – P. 61–70.

28. Santarem E. R. Multiple shoot formation in *Hypericum perforatum* L. and hypericin production. Short communication / E. R. Santarem, L. V. Astarita // Braz. J. Plant Physiol. – 2003. – № 1.

29. Xanthone bio synthesis in *Hypericum perforatum* cells provides antioxidant and antimicrobial protection upon biotic stress / G. Franklin, I. F. R. Conceicao, E. Kombrink [et al.] // Phytochemistry. – 2009. – № 70. – P. 65–73.

О. С. Коваль¹, Л. В. Фтемова², Н. М. Дробык²

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. Я. ГОРБАЧЕВСКОГО¹
ТЕРНОПОЛЬСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ВЛАДИМИРА ГНАТЮКА²

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА ВИДОВ РОДА *HYPERICUM* L.

Резюме

Работа посвящена обзору литературных источников, касающихся характеристики некоторых биологически активных веществ видов рода *Hypericum* L., распространенных в Украине. Приведены сведения о физиологическом действии этих веществ на организм человека и животных.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: род *Hypericum* L., флавоноиды, антраценпроизводные, ксантоны, эфирные масла, физиологическое действие.

O. S. Koval¹, L. V. Ftemova², N. M. Drobyk²

I. YA. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY¹
VOLODYMYR HNATYUK TERNOPIL NATIONAL PEDAGOGICAL UNIVERSITY²

BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES OF *HYPERICUM* L. GENUS

Summary

The article is devoted to review of literary sources in reference to biologically active substances of *Hypericum* L., species that are spread in Ukraine. The information about the physiological effects of these substances to organisms of human and animals is given.

KEY WORDS: genus *Hypericum* L., flavonoids, anthracen-derivatives, xanthenes, ethereal oils.

Отримано 13.07.12

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