

В. В. Годован, В. Й. Кресюн

СТАН СИСТЕМИ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ КЛІТИНИ ПРИ ГАЛАКТОЗАМІНОВОМУ ГЕПАТИТІ ТА ЗАСТОСУВАННІ ПОХІДНИХ ОКСІЕТИЛІДЕНДИФОСФОНАТОГЕРМАНАТІВ (Повідомлення 1)

Одеський державний медичний університет

Окиснення киснем поліненасичених жирних кислот (ПНЖК) призводить до утворення вільних радикалів ліпідної природи. Посилення процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) має суттєве значення в етіології та патогенезі багатьох захворювань, розвитку і наслідках різноманітних екстремальних впливів [1; 2]. З одного боку, продукти ПОЛ відіграють позитивну роль, тому що використовуються в організмі для синтезу біологічно активних речовин (БАР), таких як простагландинів, тромбоксанів, стероїдних гормонів тощо. З іншого боку, вони є важливими факторами ушкодження, в першу чергу, клітинних мембран [3]. У нормі процеси утворення та використання продуктів ПОЛ добре збалансовані, що визначає їх відносно низький вміст у клітинах [4].

Таким чином, збалансованість метаболічних процесів однаковою мірою залежить як від швидкості утворення ініціаторів пероксидації (вільних радикалів), так і активності антиоксидантної системи (АОС) клітини, яка призводить до їх деградації [5]. Швидкість перекисного окиснення значною мірою визначається структурною організацією ліпідів у біологічних мембранах, яка суттє-

во впливає на доступність залишків ПНЖК до кисню. Фактори, які порушують «пакування» ліпідів у біологічних мембранах, прискорюють, а фактори, які підтримують структурованість ліпідів (наприклад, холестерин), гальмують перекисне окиснення. До найважливіших стабілізаторів біологічних мембран, у першу чергу, належать природний антиоксидант (інгібітор перекисного окиснення) токоферол, інші природні антиоксиданти, такі як гормони тироксин і кортикостероїди, вітамін К, глутатіон [6]. З другого боку, властивості прооксидантів притаманні іонам металів змінної валентності, вітамінам С, D та ін. [7].

Іншими важливими регуляторними компонентами ПОЛ є ферменти, які беруть участь в утворенні (оксидази) чи загибелі (супероксиддисмутаза — СОД) активних форм кисню і вільних радикалів, а також у розкладанні перекисів без утворення вільних радикалів (каталаза, пероксидази). Активність цих ферментів також залежить від структурованості ліпідного бішару біологічних мембран [8–11]. Таким чином, стан АОС повинен відігравати важливу роль у детермінації та розвитку токсичного ураження печінки.

Саме тому важливе місце займає пошук і створення нових лікарських засобів для корекції процесів ПОЛ і, не в останню чергу, при патології печінки. Оскільки попередніми дослідженнями було доведено, що похідним оксіетилідендифосфонатогерманатів МІГУ-4, 5 і 6 властива мембраностабілізуюча дія [12], доцільно було вивчити їх вплив на антиоксидантну систему організму при токсичному ураженні печінки. Таким чином, **метою** даної роботи було з'ясування стану ферментативної складової системи антиоксидантного захисту клітини при галактозаміновому гепатиті у щурів і можливості його корекції за допомогою нових синтезованих БАР — похідних оксіетилідендифосфонатогерманатів МІГУ-4, 5 і 6.

Матеріали та методи дослідження

Досліди проводилися на щурах-самцях лінії Вістар масою 180–200 г, які знаходились у стандартних умовах віварію. Тварини (225 особин) були розподілені на 6 груп: 1-ша група (9 тварин) — контрольна; 2-га група — тварини з галактозаміновим гепатитом і довільним відновленням активності ферментів; 3-тя, 4, 5, 6-та групи — тварини з



галактозаміновим гепатитом на фоні профілактично-лікувального введення МІГУ-4, 5, 6 і препарату порівняння гептралу. Кожна група розподілялася на підгрупи по 9 тварин залежно від часу відновлення показників. Галактозаміновий гепатит спричинювали раніше описаним методом [13]. Досліджували БАР вводили внутрішньоочеревинно у раніше відпрацьованих дозах: МІГУ-4 — 17 мг/кг, МІГУ-5 — 28 мг/кг, МІГУ-6 — 18,5 мг/кг, гептрал — 10 мг/кг маси. Вводили БАР профілактично-лікувальним методом: 7 діб до введення гепатотоксину та 7 діб після його застосування. Контрольній групі тварин вводили фізіологічний розчин у відповідному об'ємі.

Найважливішими критеріями функціонального стану ферментативної частини АОС є активність СОД і каталази. Активність СОД (КФ 1.15.1.1) в еритроцитах і тканині печінки визначали за методом О. П. Макаревич і П. П. Голикова [14], принцип якого полягав у здатності СОД гальмувати реакцію автоокиснення адреналіну в адренохром при pH=10,2. Інкубаційне середовище містило: 1 мл 0,15 М натрій-карбонатного буфера з додаванням $3 \cdot 10^{-4}$ М ЕДТА (pH=10,2); 0,5 мл супернатанту досліджуваного біологічного матеріалу або води, якщо вимірювалася контрольна проба; 0,7 мл 0,005 М калій-фосфатного буфера з додаванням $1 \cdot 10^{-5}$ М ЕДТА (pH=7,8); 0,4 мл $2,25 \cdot 10^{-3}$ М водного розчину адреналіну (pH=2,5). Показники знімали на спектрофотометрі (СФ) при довжині хвилі 480 нм. За умовну одиницю активності ферменту приймали таку кількість СОД, яка потрібна для інгібування початкової швидкості автоокиснення адреналіну в указаних умовах на 50%. Відсоток гальмування (Т%) знаходили за формулою:

$$T \% = \frac{E_1 - E_3}{E_1} \cdot 100 \%,$$

де E_1 — початкова швидкість вільного, неінгібованого окиснення адреналіну (контрольна проба); $E_3 = E_1 - E_2$ — різниця між початковою швидкістю окиснення адреналіну в контролі та досліді (опт. од./хв). Активність ферменту розраховували за формулою:

$$A = \frac{2 \cdot N \cdot T \%}{(100 \% - T \%)} \cdot a$$

де А — активність СОД в ум. од./мг білка; 2 — коефіцієнт перерахунку на 1 мл внесеного в кювету розведеного біологічного матеріалу; N — розведення супернатанту; Т% — відсоток гальмування; а — кількість білка в нерозведеному біологічному матеріалі, що визначається за методом О. Н. Lowry et al. [15].

Каталазну активність (КФ 1.11.1.6) визначали методом М. А. Корольок і співавторів [16], принцип якого базується на здатності перекису водню, розщеплюваного каталазою ($2H_2O_2 \xrightarrow{\text{каталаза}} 2H_2O + O_2$), утворювати з солями молібдену стійкий забарвлений комплекс з максимумом поглинання при довжині хвилі 410 нм. Реакцію запускали додаванням гемолізату еритроцитів (1:1000) або розведеного гомогенату печінки (1:3000) до 2 мл 0,03%-го H_2O_2 . В холосту пробу замість біологічного матеріалу вносили 0,1 мл води. Через 10 хв реакцію зупиняли додаванням 1 мл 4%-го молібдату амонію, приготованого на 1 н. розчині сірчаної кислоти. Інтенсивність забарвлення вимірювали спектрофотометрично при 410 нм проти контрольної проби, яка містить замість H_2O_2 2 мл води. Активність ферменту розраховували за формулою:

$$A = \frac{0,6 \cdot \Delta E}{34 \cdot X \cdot T \cdot B}$$

де А — активність ферменту, 0,6:34 — кількість H_2O_2 , яка міститься в пробі (ммоль); ΔE — різниця екстинкції між «холостою» і дослідною пробами; X — значення екстинкції «холостої» проби; Т — час роботи ферменту (10 хв); B — кількість білка в пробі (г). Активність каталази виражали в мілімолях H_2O_2 , зруйнованої за 1 хв, на 1 г білка еритроцитів або печінки.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою IBM з використанням програм "Statgraf".

Результати дослідження та їх обговорення

Послідовно і координовано взаємодіючи між собою, важливі складові ферментативної частини АОС — СОД і каталаза — відіграють провідну роль у регуляції ПОЛ на стадії його ініціювання [17; 18]. Супероксиддисмутаза контролює ферментативну дисмутацію супероксидного аніон-радикала в найменш реакційноздатній молекулі H_2O_2 і триплетного кисню, а каталаза забезпечує подальшу детоксикацію організму від ушкоджуючої дії перекису водню, який утворювався в ході супероксиддисмутаційної реакції. Все це приводить до інгібування утворення гідроксильних радикалів, перешкоджає розвитку ПОЛ у біомембранах, сприяє руйнуванню ліпоперекисів, які вже утворилися [19].

Проведені дослідження продемонстрували, що в умовах токсичного гепатиту активність СОД вірогідно зменшувалася в еритроцитах і печінці більш ніж у 3 рази вже через 24 год після введення галактозаміну і становила відповідно ($17,87 \pm 0,79$) порівняно з контрольним рівнем — ($56,55 \pm 1,87$), а у печінці ($7,48 \pm$



$\pm 0,45$) і $(25,28 \pm 0,90)$ ум. од./мг білка (таблиця).

У цей проміжок часу активність каталази в еритроцитах зменшилася на третину, а у печінці у 2,5 разу. В абсолютних величинах це виражалось таким чином: $(116,42 \pm 3,15)$ порівняно з $(156,91 \pm 2,31)$ та у печінці відповідно $(35,11 \pm 1,12)$ і $(87,33 \pm 1,95)$ ммоль H_2O_2 / (хв·г білка). На 2-гу добу дослідження активність антирадикальних ферментів продовжувала знижуватись і досягла найбільш виражених змін. Так, активність СОД у еритроцитах і печінці зменшилася майже у 5 разів; а активність каталази — відповідно майже у 2 рази в еритроцитах та у 4,5 разу в печінці. Починаючи з 3-ї доби, активність ферментів поступово відновлювалася. При довільному відновленні активність каталази в еритроцитах досягала кон-

трольних величин на 7-му добу, а у печінці — на 10-ту добу. Активність СОД і в еритроцитах, і в печінці відновлювалася до контрольних величин тільки на 10-ту добу. Ця серія експериментів свідчить, що найбільш виражене пригнічення активності каталази відбувалось у печінці та менш виражене — у мембранах еритроцитів. Активність СОД синхронно пригнічувалась як у мембранах еритроцитів, так і у печінці. Іншим важливим фактом є те, що при галактозаміновому гепатиті суттєво пригнічувалася ферментативна складова антирадикального захисту клітини.

Курсове профілактично-лікувальне введення досліджуваних БАР показало, що вони суттєво запобігають пригніченню ферментативної частини АОС. Введення похідного нікотинової кислоти — МІГУ-4 зазначеною

дозою запобігало зміні активності як СОД, так і каталази, тобто на фоні застосування БАР активність ферментів практично не змінювалася (рисунок). Тільки наприкінці 1-ї доби (через 24 год після введення токсиканту) активність ферментів зменшувалась у середньому на 20–23 %. Проте вже через добу, тобто через 48 год після затравки, вона поверталася до вихідних величин і залишалася такою в подальшому. Результати дослідження свідчать, що МІГУ-4, разом із пригніченням ПОЛ, суттєво запобігав зменшенню активності ферментів антиоксидантного захисту — СОД і каталази, що надзвичайно позитивно характеризує фармакодинамічні властивості цієї сполуки.

Введення МІГУ-5 — похідного нікотинаміду — теж запобігало зменшенню активності СОД

Таблиця

Стан ферментної системи антирадикального захисту клітини при галактозаміновому гепатиті та довільному відновленні, n=9

Умови експерименту	Стат. показники	Каталаза, ммоль H_2O_2 / (хв·г білка)		СОД, ум. од./мг	
		Еритроцитарна маса	Печінка	Еритроцитарна маса	Печінка
1. Контроль	$M \pm m$	$156,91 \pm 2,31$	$87,33 \pm 1,95$	$56,55 \pm 1,87$	$25,28 \pm 0,90$
	%	100,0	100,0	100,0	100,0
2. Гепатит (1-ша доба)	$M \pm m$	$116,42 \pm 3,15$	$35,11 \pm 1,12$	$17,87 \pm 0,79$	$7,48 \pm 0,45$
	% (2–1)	74,2*	40,2*	31,6*	29,6*
3. Гепатит (2-га доба)	$M \pm m$	$93,52 \pm 1,75$	$19,74 \pm 0,87$	$11,65 \pm 0,60$	$5,00 \pm 0,37$
	% (3–1)	59,6*	22,6*	20,6*	19,8*
4. Гепатит (3-тя доба)	$M \pm m$	$94,30 \pm 2,05$	$18,16 \pm 1,05$	$14,37 \pm 0,75$	$6,95 \pm 0,29$
	% (4–1)	60,1*	20,8*	25,4*	27,5*
5. Гепатит (5-та доба)	$M \pm m$	$118,31 \pm 2,95$	$45,76 \pm 2,15$	$22,45 \pm 1,15$	$13,85 \pm 0,75$
	% (5–1)	75,4*	52,4*	39,7*	54,8*
6. Гепатит (7-ма доба)	$M \pm m$	$142,00 \pm 3,46$	$62,79 \pm 2,21$	$33,87 \pm 1,27$	$16,48 \pm 1,45$
	% (6–1)	90,5	71,9*	59,9*	65,2*
7. Гепатит (10-та доба)	$M \pm m$	$149,22 \pm 3,15$	$78,33 \pm 1,75$	$48,46 \pm 1,50$	$22,52 \pm 1,67$
	% (7–1)	95,1	89,7	85,7	89,1

Примітка. * — вірогідність при $P < 0,05$.



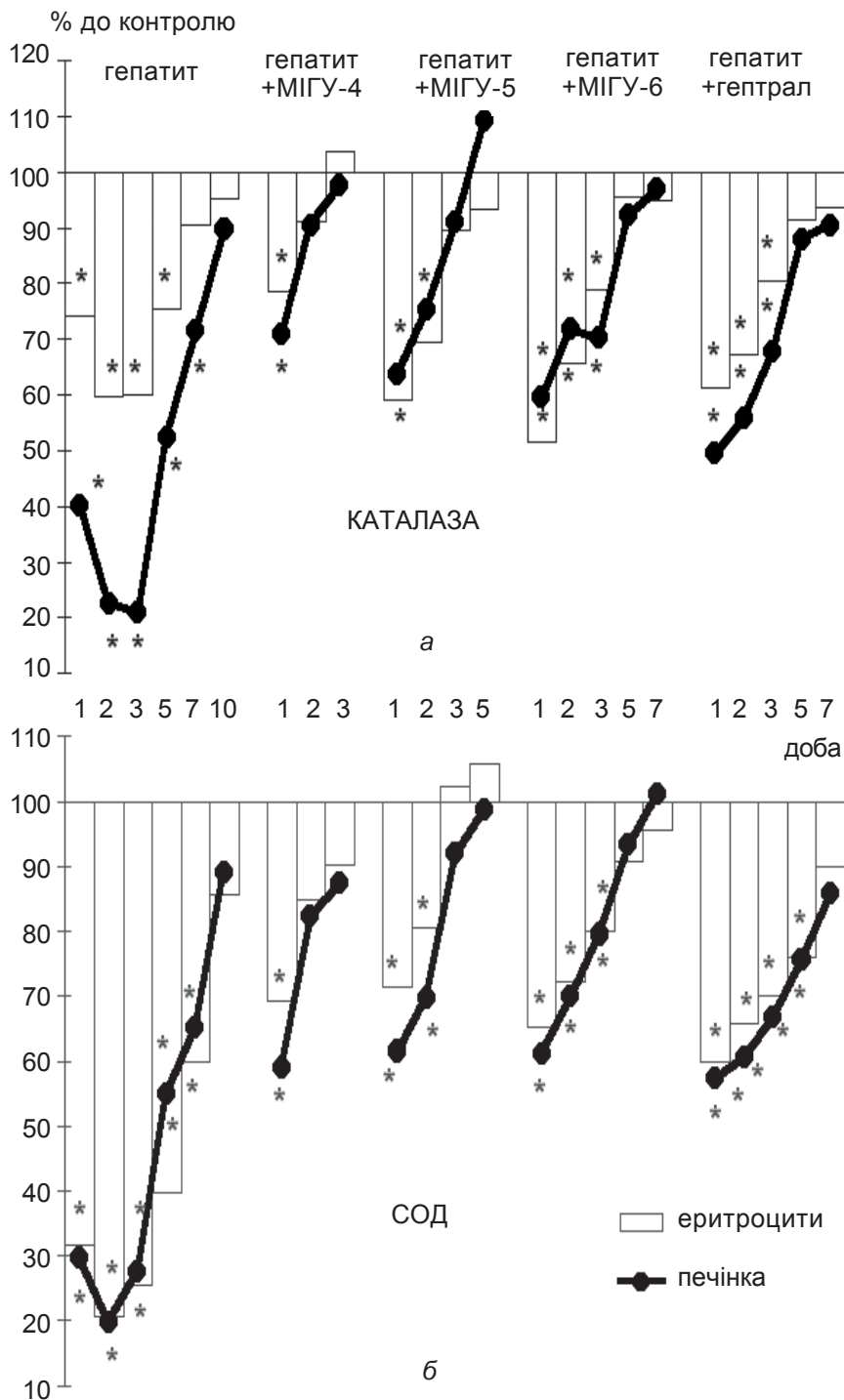


Рисунок. Вплив БАР на вміст каталази (а) і СОД (б) у мембранах еритроцитів і печінці щурів в умовах галактозамінового гепатиту; * — вірогідність щодо контролю ($P < 0,05$)

і каталази. Причому за глибиною дії МІГУ-5 не відрізнявся від МІГУ-4 з тією тільки різницею, що відновлення активності ферментів відбувалося на 3-тю добу спостереження (на відміну від 2-ї доби при застосуванні МІГУ-4). Подальші

дослідження показали, що активність СОД і каталази стійко зберігалася на контрольних величинах (див. рисунок).

Профілактичну дію проявив МІГУ-6 (магній-оксєтилєнди-фосфонатогєрманат), тобто запобігав різкому пригніченню

активності досліджуваних показників. Однак ефективність цієї дії значно відрізнялася від впливу МІГУ-5 і особливо МІГУ-4. Відновлення активності ферментів при галактозаміновому гепатиті відбувалося на 5-ту добу (при довільному відновленні — на 7-му–10-ту добу).

Нарешті введення препарату порівняння — гептралу — продемонструвало, що активність каталази, зміни якої при відтвореному гепатиті були менш вираженими, ніж СОД, відновлювалася на 5-ту добу, аналогічно дії МІГУ-6, а СОД — на 7-му добу.

Таким чином, похідні оксєтилєнди-фосфонатогєрманатів із біолігандами виявили виражену запобігаючу дію щодо пригнічення активності ферментів антирадикального захисту клітин при галактозаміновому гепатиті. Аналізуючи дію БАР, які вивчаються, слід зазначити, що фермент СОД інактивує супероксид аніон-радикал у всіх кисень-використовуючих клітинах; каталізує реакцію дисмутази супероксидного аніон-радикала, швидкість якої дуже велика і лімітується швидкістю дифузії $O_2^{\cdot -}$. Крім цього, СОД здійснює інактивацію радикалів, які виникають у процесі окислювально-відновних реакцій у мітохондріях або при взаємодії металів зі змінною валентністю, під впливом іонізуючого, ультрафіолетового випромінювання, ультразвуку, гіпербаричної оксигенації [3].

Інший внутрішньоклітинний фермент першої лінії антиоксидантного захисту — каталаза — запобігає нагромадженню в клітині перекису водню, який утворюється при аеробному окисненні. Каталаза — вискоєфективний фермент, який не потребує затрат енергії для активації, тому він більш стійкий до різних патологічних ушкоджень [20], що й було продемонстровано у наших дослідженнях.



Вищенаведене свідчить, що вивчення активності двох ферментів — СОД і каталази — є адекватним для того, щоб зробити висновок про стан ферментативної складової антирадикального захисту при даній патології.

Висновки

1. Галактозаміновий гепатит суттєво пригнічував ферментативну складову антирадикального захисту клітини.

2. Вже через 24 год активність СОД вірогідно зменшувалася в еритроцитах і печінці більше ніж у 3 рази; активність каталази в еритроцитах знижувалася на третину, а у печінці — у 2,5 разу.

3. На 2-гу добу дослідження активність ферментів продовжувала знижуватись і досягла найбільш виражених змін. Наприклад, активність СОД у еритроцитах та печінці зменшилася майже у 5 разів; активність каталази — відповідно майже у 2 та 4,5 разу.

4. Починаючи з 3-ї доби, активність ферментів поступово відновлювалася. Довільне відновлення активності ферментів свідчить, що активність каталази у еритроцитах нормалізувалася на 7-му добу, а у печінці — на 10-ту добу. Активність СОД і в еритроцитах, і в печінці відновлювалася на 10-ту добу.

5. Курсове профілактично-лікувальне введення похідного нікотинової кислоти — МІГУ-4 запобігало зміні активності як СОД, так і каталази, тобто на фоні застосування БАР активність ферментів практично не змінювалася. Таким чином, МІГУ-4, разом із пригніченням ПОЛ, суттєво запобігав зменшенню активності ферментів антиоксидантного захисту клітини.

6. Введення МІГУ-5 — похідного нікотинаміду — теж запобігало пригніченню активності

ферментів антирадикального захисту. При цьому, за силою дії МІГУ-5 не відрізнявся від МІГУ-4. Різниця полягала тільки у тому, що при введенні МІГУ-5 активність ферментів нормалізувалася на 3-тю добу (при введенні МІГУ-4 — на 2-гу добу).

7. Профілактична дія як запобігання пригнічення СОД і каталази властива і МІГУ-6 — БАР, яка включає оксіетилідендіфосфонову кислоту, германій та магній. Однак, ефективність МІГУ-6 менша від МІГУ-5, а особливо МІГУ-4.

8. За ефективністю препарат порівняння гептрал поступався досліджуваним сполукам. При його введенні активність каталази і СОД нормалізувалася відповідно на 5-ту та 7-му добу спостереження.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Владимиров Ю. А., Арчаков А. И.* Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М.: Наука, 1972. — 252 с.

2. *Чеснокова Н. П., Понукалина Е. В., Бизенкова М. Н.* Общая характеристика источников образования свободных радикалов и антиоксидантных систем // *Успехи совр. естествознания.* — 2006. — № 7. — С. 37-41.

3. *Зенков Н. К., Лапкин В. З., Меньщикова Е. Б.* Окислительный стресс. Биохимические и патофизиологические аспекты. — М.: Наука / Интерпримодика, 2001. — 343 с.

4. *Ленинджер А.* Биохимия. Молекулярные основы структуры и функции клетки. — М.: Мир, 1999. — С. 390-422.

5. *Владимиров Ю. А.* Свободные радикалы в биологических системах // *Соросовский образовательный журнал.* — 2000. — Т. 6, № 12. — С. 13-19.

6. *Stocker R., Frei B.* Endogenous antioxidant defences in human blood plasma // *Oxidative stress: oxidants and antioxidants* / Sies H. ed. — London: Academic Press, 1991. — P. 213-243.

7. *Меньщикова Е. В., Зенков Н. Н.* Антиоксиданты и ингибиторы ради-

кальных окислительных процессов // *Успехи совр. биологии.* — 1993. — Т. 113, вып. 4. — С. 442-453.

8. *Дубинина Е. Е.* Антиоксидантная система плазмы крови // *Укр. биохим. журнал.* — 1990. — Т. 64, № 2. — С. 3-15.

9. *Система антиоксидантной защиты организма и старение* / А. А. Подколзин, А. Г. Мегреладзе, В. И. Донцов и др. // *Профилактика старения.* — 2000. — № 3. — С. 34-39.

10. *Матюшин Е. Н., Логинов А. С.* Активные формы кислорода: цитотоксическое действие и методические подходы к лабораторному контролю при поражениях печени (обзор литературы) // *Клин. лаб. диагностика.* — 1996. — № 4. — С. 51-54.

11. *Зайцев В. Г., Закревский В. И.* Методологические аспекты исследований свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма // *Вестн. Волгоград. мед. академии.* — 1998. — Вып. 4. — С. 49-53.

12. *Годован В. В., Кресюн В. Й.* Патогенетичні механізми гепатозахисної дії нових похідних нікотинової кислоти та нікотинаміду // *Інтегративна антропологія.* — 2007. — № 1. — С. 61-68.

13. *Годован В. В., Кресюн Н. В.* Галактозаміновий гепатит як модель вивчення морфофункціональних порушень клітинних мембран // *Одес. мед. журнал.* — 2005. — № 3. — С. 11-15.

14. *Макаревич О. П., Голиков П. П.* Активность супероксиддисмутазы крови в острый период различных заболеваний // *Лабор. дело.* — 1983. — № 6. — С. 24-27.

15. *Protein measurement with the Folin Phenol reagent* / O. Y. Lowry, N. J. Rosenberough, A. L. Farr, R. J. Randall // *J. Biol. Chem.* — 1951. — Vol. 193, N 1. — P. 265-275.

16. *Метод определения активности каталазы* / М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова, В. Е. Токарев // *Лабор. дело.* — 1988. — № 1. — С. 16-19.

17. *Поберезкина Н. Б., Осинская Л. Ф.* Биологическая роль супероксиддисмутазы // *Укр. биохим. журнал.* — 1989. — Т. 61, № 2. — С. 14-27.

18. *Liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride and the effect of super-*



oxide dismutase and xanthine oxidase inhibitor treatment / H. M. Dashti, H. al-Sayer, A. Behbehani et al. // J. R. Coll. Surg. Edinb. — 1992. — Vol. 37, N 1. — P. 23-28.

19. *Владимиров Ю. А.* Роль нарушенных свойств липидного слоя мембран в развитии патологических процессов // Патол. физиол. и эксперим. терапия. — 1989. — № 4. — С. 7-19.

20. *Лукьянова Л. Д., Балмуханов Б. С., Уголев А. Т.* Кислородзависимые процессы в клетке и ее функциональное состояние. — М.: Наука, 1982. — 298 с.

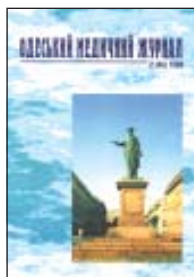
*Передплачуйте
і читайте*

ОДЕСЬКИЙ МЕДИЧНИЙ ЖУРНАЛ

Передплата приймається у будь-якому передплатному пункті

У випусках журналу:

- ◆ Теорія і експеримент
- ◆ Клінічна практика
- ◆ Профілактика, реабілітація, валеологія
- ◆ Нові технології
- ◆ Огляди, рецензії, дискусії



Ціна передплати на півріччя (три номери):

- для підприємств та організацій — 60 грн;
- для індивідуальних передплатників — 30 грн.

Передплатні індекси:

- для підприємств та організацій — 48717;
- для індивідуальних передплатників — 48405.

