

ОРИГІНАЛЬНІ СТАТТІ

УДК: 616–001.4–092–06: 616.126–092.9]:(615.28+615.274)

Р.З. ОГОНОВСЬКИЙ

АКТИВНІСТЬ СИСТЕМИ ГЛУТАТІОНУ В АНТИОКСИДАНТНИХ РЕАКЦІЯХ, ЩО ВІДБУВАЛИСЯ У ДЕРМАЛЬНИХ ТКАНИНАХ ТВАРИН, ЯКІ ПЕРЕНЕСЛИ ГОСТРУ АДРЕНАЛІНОВУ МІОКАРДІОДИСТРОФІЮ

В статті представлені результати біохімічного дослідження показателів глутатионової складової антиоксидантної системи в дермальних тканинах експериментальних тварин (білих крыс-самців), які перенесли гостру адреналінову міокардіодистрофію в строки 3, 5, 7, 10, 14 і 21 суток.

Установлено, що на 3-і сутки в дермальних тканинах домінують процеси перекисного окислення, антиоксидантна система функціонує з перегазку і не в состоганні забезпечити фізіологічне рівновазі, а антиоксидантний статус організму зміщен в прооксидантному напрямленні.

После компенсації функції серцевої м'язи і цілої гемодинамічної системи, нормалізації содержимого кислого в крові (що проиходит в строки между 7-14 днями после моделювання міокардіодистрофії), отмечено сбалансування процесов окислення органічних соедіненій. Антиоксидантна система полностью виконє свою буферну функцію, а все показателі приближаються к показателям норми.

Ключевые слова: *остра адреналінова міокардіодистрофія, кожні покрови, перекисне окислення ліпідів, глутатион.*

ВСТУП

Гіпоксія – поширений патологічний стан, який супроводжується функціонально-метаболічними порушеннями у внутрішніх органах внаслідок зменшення постачання тканин киснем. Різноманітні форми гіпоксії спричиняють порушення діяльності дихальної, серцево-судинної систем, ушкодження головного мозку, викликають порушення метаболічної активності у всіх органах та тканинах ушкодженого організму [10].

Гостре адреналінове пошкодження міокарду викликає розлади серцевої діяльності, які проявляються у зниженні його насосної функції, що приводить до зменшення хвилинного об'єму серця. Наслідком цього є сповільнення кровотоку (особливо в системі мікроциркуляції) та недостатнє кровопостачання тканин та виникає гемодинамічна гіпоксія [4].

Однією з особливостей цього стану є активація перекисного окислення ліпідів, збільшення кількості прооксидантних процесів, що виникає як наслідок впливу на живу систему гемодинамічних порушень та спричинених нею гіпоксичних явищ. Збільшення концентрації продуктів перекисного окислення ліпідів вище базального "нормо-фізіологічного" рівня дають загрозу окислювальної деструкції мембранних структур клітин та суттєво видозмінюють реактивність організму на зовнішні подразники [14].

Поряд з ферментативною системою, яку в основному розглядають як антиоксидантами гідрофільної фази, існують і інші, неферментативні механізми захисту від вільнорадикальних сполук. Одною з таких є система низькомолекулярних тіолів – відновленого глутатіону (GSH), який за своїм механізмом дії розглядається як донатор протону в системі складних окисно-відновних реакцій. Важливість цієї системи захисту доповнюється і тим, що вона високо ефективна як у водній, так і ліпідній фазі біологічних мембран [1].

У склад цього ланцюгу антиоксидантного захисту, окрім відновленого глутатіону, входять ферменти глутатіонпероксидаза (GSH-пероксидаза) та глутатіонредуктаза (GSH-редуктаза). Ефективність першого ферменту залежить від наявності вільного глутатіону, а за механізмом дії вона, як і каталаза, сприяє видаленню перекису водню, а з ферментом фосфоліпазою попереджає розгалуження ланцюгів окислення ліпідів в мембранах. Функція ж глутатіонредуктази полягає у каталізації процесу відновлення глутатіону із окисленого стану внаслідок попередньо описаної реакції [1].

Як експериментальну модель міокардіодистрофії нами було обрано методику одноразовим внутрішньоочеревинним введенням великої дози розчину катехоламінів [5]. Дану модель широко використовують для дослідження некротичних процесів міокарда та протекторної дії різноманітних кардіотропних препаратів [3, 4, 7, 9, 11, 12, 13].

Аналіз доступної літератури вказує на недостатнє дослідження впливу цієї моделі на метаболічні процеси в дермальних тканинах у пізніх етапах її розвитку, зокрема, у ключових періодах перебігу експериментального інфікованого ранового процесу.

Враховуючи важливість цієї складної та високої її ефективність, **метою** було вивчення особливостей функціонування системи глутатіону як складової частки антиоксидантного захисту шкірних покривів у тварин, яким моделювалася гостра адреналінова міокардіодистрофія.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.

Так як у подальших дослідженнях планується дослідити вплив гострого адреналінового пошкодження на перебіг загоєння експериментальної інфікованої дерматомної рани, що є тривалим процесом, ми обрали для своїх досліджень терміни, що відповідають ключовим її етапам загоєння – 3, 5, 7, 10, 14, 21 доби, коли послідовно змінюється фаза гострих запальних явищ з вираженою гідратацією, фазами деградації та некролізу, початком розвитку грануляцій, повним вивоненням поверхні рани грануляційною тканиною, початком курасвої епітелізації та завершенням рубцювання [2].

Усі тварини (білі щурі-самці масою 200-220 г) були розділені на 7-м груп по 10 осіб у кожній. Перша слугувала у якості неушкодженого контролю. Іншим моделювали адреналінову міокардіодистрофію за методикою О.О. Маркової (1998), шляхом внутрішньоочеревинного введення 0,18% розчину адреналіну гідротартрату ("Дарниця", Україна) з розрахунку 1 мг/кг ваги [5].

Після декапітації за умов передозованого внутрішньочеревного кетамінового наркозу проводили у попередньо вказані терміни епіляцію в міжлопатковій ділянці та витинали шматочок шкіри розміром 1,5x1,5 см. У замороженому в рідкому азоті стані біотичний матеріал передавали в біохімічну лабораторію.

Як показники функціонування досліджуваної системи, визначали вміст відновленого глутатіону визначали за методом З.Батлер, О.Дюбон, Б.Келли [6], глутатіонпероксидазу та глутатіонредуктази активність за методом Моїна В.М. [8].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ.

Отримані цифрові дані результатів дослідження представлено в таблиці 1.

Проведені дослідження визначили наступні показники у неушкоджених тварин, прийнятих як вихідний показник норми: 0,295±0,010 мМ для глутатіону, 7,445±0,010 мкМоль/мг білка за хв для глутатіонпероксидаза та 0,598±0,009 нМоль NADH⁺/ хв•мг білка для глутатіонредуктази.

Таблиця 1. Стан системи глутатіону антиоксидантного буферу в дермально-м'язовій тканині щурів на тлі гострої адреналінової міокардіодеструкції, (M±m, n=10).

Отримані результати у терміни спостереження						
Інтактні тварини	3 доба	5 доба	7 доба	10 доба	14 доба	21 доба
Відновлений глутатіон, мМ						
0,295±0,010	0,260±0,008* p≤0,001	0,265±0,005* p≤0,001	0,285±0,010 p=0,053	0,295±0,010 p=1	0,295±0,005 p=1	0,300±0,008 p=0,258
Глутатіонпероксидаза, мкМоль/мг білка за хв						
7,445±0,010	8,363±0,061* p≤0,001	8,345±0,018* p≤0,001	8,025±0,010* p≤0,001	7,690±0,034* p≤0,001	7,495±0,039* p=0,001	7,452±0,014 p=0,241
Глутатіонредуктаза, нМоль NADH ⁺ / хв•мг білка						
0,598±0,009	0,795±0,015* p≤0,001	0,780±0,009* p≤0,001	0,731±0,007* p≤0,001	0,643±0,004* p≤0,001	0,614±0,008* p≤0,001	0,602±0,004 p=0,226

* – статистично достовірні різниці даних за відношенням до величин в контрольній групі

Як видно із таблиці, усі термінальні результати у ході дослідження було виявлено у початковому терміні – на 3 добу. У цей час концентрація глутатіону спадала в 1,13 рази до рівня $0,260 \pm 0,008$ мМ, що свідчило про його активне використання в процесах нейтралізації вільно радикальних сполук та продуктів перекисного окиснення ліпідів; активність глутатіонпероксидаза, яка у комбінації з глутатіоном нейтралізує перекис водню та перешкоджає розгалуженню ланцюгової реакції ліпоокиснення, зростала 1,12 рази від показника прийнятої норми і була на рівні $8,363 \pm 0,061$ мкМоль/мг білка за хв; у зв'язку із інтенсивним окиснення глутатіону у ході біохімічних реакцій нейтралізації радикальних сполук, природно, що в тканинах виникає потреба у його швидшому відновленні, і у зв'язку із цим активізується відповідна компенсаторна система глутатіонредуктаза – у цифровому значенні показники досягали межі $0,795 \pm 0,015$ нМоль NADH^+ /хв•мг білка, що у 1,32 рази перевищує дані контрольної групи.

Наступні терміни спостереження характеризувалися поступовим поверненням до фізіологічної норми. Так, на 5-ту добу концентрація відновленого глутатіону була ще статистично достовірно меншою за показник норми та становила $0,265 \pm 0,005$ мМ. Проте вже на 7-ий день цей показник наблизився до даних, отриманих у контрольних тварин і склав $0,285 \pm 0,010$ мМ (при $p=0,053$). В подальші доби спостереження показники дослідних та контрольних тварин не відрізнялися між собою.

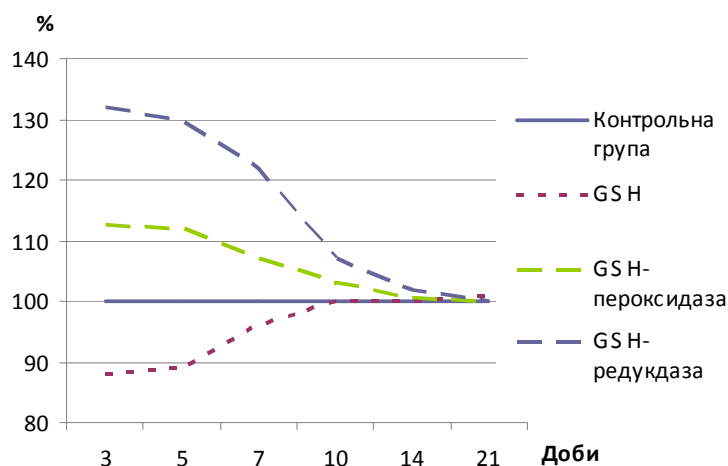
Нормалізація показників ферментативної складової системи глутатіону була більш інертною, характеризувалася більш плавним падінням цифрових показників, що свідчило про продовження вільнорадикального окиснення ліпідів, але цей процес набрав ознак компенсованого характеру.

Так, на 7-у добу спостереження активність глутатіонпероксидаза була рівні $8,025 \pm 0,010$ мкМоль/мг білка за хв, а глутатіонредуктаза – $0,731 \pm 0,007$ нМоль NADH^+ /хв•мг білка. Максимальне наближення до показників норми було виявлено лише на 14-у добу, коли цифрові дані виявляли $7,495 \pm 0,039$ $8,025 \pm 0,010$ мкМоль/мг білка за хв для глутатіонпероксидаза та $0,614 \pm 0,008$ нМоль NADH^+ /хв•мг білка у глутатіонредуктази.

Кінцевий термін спостереження характеризувався повним поверненням досліджуваних показників до рівня норми, що свідчило про настання балансу між окиснення та відновлення органічних структур в тканинах. На 21-у добу абсолютні показники при дослідженні глутатіонпероксидаза виявлені на рівні $7,452 \pm 0,014$ мкМоль/мг білка за хв., а глутатіонредуктаза – $0,602 \pm 0,004$ нМоль NADH^+ /хв•мг білка.

На рис. 1 представлено порівняльну динаміку змін досліджуваних показників системи глутатіону за відношення до нормо-фізіологічного рівня, який прийнято як 100%.

Рис. 1. Динаміка зміни глутатіон-залежної антиоксидантної системи в дермальних тканинах тварин з адреналіновою міокардіодеструкцією.



Ферментна складова глутатіон-залежної системи антиоксидантного захисту, а саме глутатіонпероксидаза, у початкові терміни виявила найбільш свої активність, яка складала 112,33% від показника норми. Її функціонування пов'язане із використанням запасів відновленого

глутатіону. Природно, що у цей час його концентрація зменшується у тканинах до 88,13%, що в свою чергу зумовлює більш необхідність регенерацію з окисного стану. Цю функцію виконує ще один фермент цієї системи – глутатіоредуктаза, активність якої зростає до 132,94%.

Отримані дані свідчать про інтенсивний перебіг у цей час відновних реакцій, скерованих на нейтралізацію збільшеної кількості вільних радикалів та продуктів їх взаємодії з органічними сполуками та відновлення гомеостазу в тканинах.

У період між 3-5 добами, стан глутатіон-залежної системи антиоксидантного захисту суттєво не змінювався: так концентрація відновленого глутатіону виросла до 89,83%, а активність ферментів знизилася до 112,08% у випадку глутатіонпероксидази, та 130,43% глутатіоредуктази. Вказані дані свідчать про подальше напруження антиоксидантного статусу організму.

У наступному терміні дослідження вже чітко визначається тенденція до нормалізації процесів перекисного окиснення органічних структур тканин і падінням активності глутатіонпероксидази до 107,79% і глутатіоредуктази до 122,24% від показника контрольної групи, та зростанням концентрації відновленого глутатіону до 96,61%.

10-та доба була відзначена нормалізацією концентрації відновленого глутатіону, і у всі подальші терміни отримані дані не відрізнялися від показників норми.

Ферментативна складова цієї системи також наблизилася до фізіологічних нормативів: на 10-у добу активність глутатіонпероксидази становила 103,29%, на 14-у – 100,67%, на 21-у – 100,09% показника норми.

Дещо інертнішою була нормалізація функції глутатіоредуктази: від 107,52% до 102,76% та 100,66% відповідно.

ВИСНОВКИ

1. Підводячи підсумки цього етапу дослідження, можна констатувати, що гостра адреналінова міокардіодистрофія суттєво вплинула на антиоксидантний статус організму.

2. Внаслідок гострих гемодинамічних зрушень, зумовлених зменшенням інтенсивності серцевого викиду та зумовлених цим порушень в мікроциркуляторному руслі, в тканинах активно розпочинаються процеси вільнорадикального окиснення органічних структур, в першу чергу ліпідного вмісту. У відповідь на масивне утворення вільних радикалів, активізується система антиоксидантного захисту: у 1,12 для глутатіонпероксидази, а концентрація відновленого глутатіону зменшується у 1,13 рази за відношенням до показників неушкодженого контролю.

3. Вказані дані свідчать, що на 3-ю добу в термальних тканинах щурів з гострим адреналіновим пошкодженням міокарду домінують процеси перекисного окиснення, антиоксидантна система функціонує з перевантаження і не в стані забезпечити фізіологічну рівновагу, а антиоксидантний статус організму зміщений в прооксидантному напрямку.

4. Після компенсації функції серцевого м'язу та цілої гемодинамічної системи, нормалізації вмісту кисню в крові (що відбувається у терміни між 7-14 днями після моделювання міокардіодеструкції), відмічено і збалансування процесів окиснення органічних сполук. Антиоксидантна система повністю виконує свою буферну функцію, а всі показники наближаються до показників норми.

5. Завершальний термін спостереження (21 доба) характеризувався абсолютним повернення антиоксидантного статусу до показників фізіологічного гомеостазу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Барабой В.А. Окислительно-антиоксидантный гомеостаз в норме и патологии/ В.А.Барабой, Д.А.Сутковой. – Киев: Черновбильинтеринформ, 1997. – 127 с.
2. Даценко Б.М. Патофизиология и морфология гнойной раны/ Б.М.Даценко, Т.И.Тамм // Клінічна хірургія. – 2003. – №11. – С.46-47.
3. Лепявко А.А. Морфометричний аналіз ступеня структурного пошкодження міокарда в щурів різного віку і статі при дії токсичної дози адреналіну/ А.А.Лепявко, М.Р.Хара// Клінічна та експериментальна патологія. – 2009. – Т.8, №1. – С.29-31.
4. Лебедева Т.А. Вплив попередників та блокувальників синтезу оксиду азоту на метаболічні процеси в ушкодженому адреналіновим міокарді в експерименті: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд.мед.наук: спец. 14.03.04 "Патологічна фізіологія"/ Т.А.Лебедева. – Тернопіль, 2009. – 23 с.
5. Маркова О.О. Міокардіодистрофія і реактивність організму/ О.О.Маркова. – Тернопіль : Укрмедкнига, 1998. – 152 с.
6. Методика определения уровня восстановленного глутатиона (GSH) в эритроцитах крови (по принципу З.Батлер, О.Дюбон, Б.Келли, 1963) // Методические рекомендации по дифференциальной диагностике различных форм ишемической болезни сердца с использованием определения компонентов глутатионовой противоперекисной каталитической системы в эритроцитах крови. – Одеса, 1982. – С.16-20.

7. Мисула І.Р. Морфологічні зміни серцевого м'язу щурів при гіпоергічному та гіперергічному перебігу адреналінової міокардіопатії в експерименті/ І.Р.Мисула, А.Б.Бойків// Здобутки клінічної та експериментальної медицини. – 2008. – Т.8, №1. – С.47-51.
8. Моин В.М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах/ В.М.Моин// Лабораторное дело. – 1986. – №12. – С.724-727.
9. Чевари С. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте/ С.Чевари, Т.Андыл, Я.Штрэнгер// Лабораторное дело. – 1991. – №10. – С.9-13.
10. Augmentation of hypoxia – induced nitric oxide generation in the rat carotid body adapted to chronic hypoxia: an involvement of constitutive and inducible nitric oxide synthases/ Y.S.Ye, G.L.Tipoe, P.C.Fung, M.L.Fung// Pflügers Archiv – 2002. – Vol. 444, №1-2. – P.178–185.
11. Brown G.C. Nitric oxide and mitochondrial respiration in the heart/ G.C.Brown, V.Borutaite// Cardiovascular Research. – 2007. – Vol.75, №2. – P.283–290.
12. Crataegus tanacetifolia leaf extract prevents L-NAME-induced hypertension in rats: a morphological study / Z.C.Koçyildiz, H.Birman, V.Olgaç et al// Phytotherapy Research. – 2006. – Vol.20, №1. – P.66–70.
13. Modulation of fatty acids oxidation in heart failure by selective pharmacological inhibition of 3-ketoacyl coenzyme-A thiolase/ G.Fragasso, R.Spoladore, A.Cuko, A.Pallosi// Current Clinical Pharmacology. – 2007. – Vol.2, №3. – P.190–196.
14. The effects of antioxidants and nitric oxide modulators of hepatic ischemic-reperfusion injury in rats/ J.E.Rhec, S.E.Jung, S.D.Shin et al// Journal of Korean Medical Science. – 2002. – Vol.17, №4. – P.502–506.

R.Z. OGOVSKY

ACTIVITY OF THE GLUTATHIONE SYSTEM IN ANTIOXIDANT REACTIONS, WHICH TOOK PLACE IN DERMAL TISSUES OF ANIMALS, WHICH CARRIED SHARP ADRENALIN MYOCARDIAL DYSTROPHY

In the article are presented the biochemical research results of glutathione antioxidant systems state indexes in dermal fabrics of experimental animals (white rats-males), which carried sharp adrenalin myocardial dystrophy in terms 3, 5, 7, 10, 14 and 21 twenty-four hours.

It is set that on 3th twenty-four hours in dermal tissues prevail processes of peroxidations, the antioxidant system functions from an overload and unable to provide a physiology equilibrium, and antioxidant status of organism is displaced in prooxidant direction.

After indemnification of myocardium function and whole haemodynamic system, normalization of the contained oxygen in blood (that takes place in terms between 7-14 days after the design of myocardial dystrophy), balancing of processes of oxidization of organic compounds is marked. Antioxidant the system performs the buffer duty fully, and all indexes approach the indexes of norm.

Key words: acute adrenalin myocardial dystrophy, skin covers, peroxidations of lipids, glutathione.

Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького

Кафедра хірургічної стоматології та щелепово-лицевої хірургії

Кафедра патологічної фізіології

м. Львів

Відомості про автора: Огоновський Роман Зіновійович – кандидат медичних наук, доцент кафедри хірургічної стоматології та щелепово-лицевої хірургії ЛНМУ ім. Данила Галицького;

адреса домашня – м. Львів, 79060, вул. Наукова 24, кв. 68, телефон – 2631084; мобільний – 0673696086;

адреса робоча – м. Львів, 79010, вул. Пекарська 69, Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького, кафедра хірургічної стоматології та щелепово-лицевої хірургії, телефон – 2786318.

e-mail – ogonov@meta.ua