

ПРОТИЗАПАЛЬНИЙ І РАНОЗАГОЮВАЛЬНИЙ ЕФЕКТИ НОВОГО ЛІКУВАЛЬНОГО ГЕЛЮ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ СТОМАТИТИ

У досліджах на білих щурах вивчали захисний вплив нового лікувального гелю на процеси регенерації в слизовій оболонці рота при експериментальному травматичному стоматиті. Аплікації розробленого лікувального гелю прискорювали терміни лікування, нормалізуючи біохімічні показники, які характеризують стан переокисного окиснення ліпідів і рівень маркерів запалення слизової оболонки порожнини рота, та чинили захисну дію на перебіг ранового процесу і загоювання слизової оболонки рота у щурів.

Ключові слова: переокисне окиснення ліпідів, маркери запалення, травматичний стоматит, лікування, процеси регенерації.

ANTI-INFLAMMATORY AND WOUND HEALING EFFECTS OF NEW TREATMENT GEL UNDER EXPERIMENTAL STOMATITIS

The protective effects of the new treatment gel upon the regenerative processes in oral mucous membrane under the experimental trauma stomatitis were studied during the experiments of white rats. The application of the elaborated treatment gel shortened the terms of treatment, improved the biochemical indices, that characterize LPO state and the level of markers of inflammation in the oral mucosa, and made protective influence upon the course of wound process and healing of rats' oral mucosa.

Key words: lipids peroxidation, inflammatory markers, trauma stomatitis, treatment, regenerative processes.

УДК 577.152.3+616+546

І. І. Гринюк, канд. біол. наук,
С. В. Прилуцька, канд. біол. наук,
С. М. Гребіник,
А. Г. Михайлова,
Д. В. Франкевич,
О. П. Матишевська, д-р біол. наук, проф.

ПОКАЗНИКИ АКТИВНОСТІ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ У НОРМАЛЬНИХ І ТРАНСФОРМОВАНИХ КЛІТИНАХ

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Вступ

Внаслідок окисно-відновних реакцій в організмі людини та тварини постійно відбувається генерація активних форм кисню (АФК), які відіграють важливу роль у багатьох процесах — клітинній проліферації, синтезі біологічно активних речовин, передачі сигналів у регуляторних системах, індукції апоптозу [1].

Для запобігання надмірному утворенню АФК у клітині та нейтралізації їх ушкоджувальної дії в організмі існує антиоксидантна система (АОС) захисту, важливими складовими якої є антиоксидантні ферменти (АОЕ) — супероксиддисмутаза (СОД, КФ 1.15.1.1) і глутатіон-залежні глутатіонпероксидаза (ГП, КФ 1.11.1.9), глутатіонредуктаза (ГР, КФ 1.8.1.7)

та глутатіон-S-трансфераза (ГТ, КФ 2.5.1.18). Антиоксидантні ферменти характеризуються високою специфічністю дії та здатні перехоплювати АФК, перетворюючи їх на менш шкідливі сполуки, або ж нейтралізувати джерело їх виникнення.

Надмірна активація процесів вільнорадикального переокищення спричинює каскад негативних реакцій і патологічних змін, які лежать в основі багатьох захворювань людини та тварин. Зокрема, вільні радикали залучені до порушення експресії генів, які контролюють ріст і диференціацію клітин і відіграють важливу роль у розвитку злоякісних пухлин [2].

Відомо, що ракові клітини посилено продукують АФК і зазнають більшого оксидатив-

ного стресу порівняно з нормальними через підвищену метаболічну активність, онкогенну стимуляцію та порушення у функціонуванні електрон-транспортного ланцюга мітохондрій [3]. Загалом трансформованим клітинам властивий підвищений антиоксидантний потенціал як пристосування до внутрішнього оксидативного стресу, проте дані щодо функціонального стану окремих АОЕ суперечливі, оскільки їх експресія й активність залежать від типу, походження та ступеня диференціації клітин [4–8]. Дослідження стану АОЕ та пошук способів модуляції їх активності в онкотрансформованих клітинах є актуальними, оскільки можуть сприяти розробці стратегій пригнічення пухлинного росту.

Сьогодні значну зацікавленість викликає новий клас вуглецевих наноструктур — фулерени C_{60} , яким притаманні унікальні фізико-хімічні властивості та біологічна активність. Завдяки сферичній формі, малим розмірам (0,72 нм у діаметрі) та гідрофобним властивостям молекула C_{60} може локалізуватись у клітинній мембрані та проникати всередину клітин [9; 10], а через наявність кон'югованої системи подвійних міжвуглецевих зв'язків — взаємодіяти з вільними радикалами та нейтралізувати їх.

Мета роботи — порівняльна оцінка активності антиоксидантних ензимів у клітинах різних типів і походження — нормальних попередників Т-лімфоцитів (ізольовані тимоцити щура), трансформованих Т-лімфоцитах L1210 і клітинах асцитної карциноми Ерліха у контролі та за умови преінкубації з фулереном C_{60} .

Матеріали та методи дослідження

Тимоцити одержували шляхом протирання тимуса щурів (маса 120–150 г) лінії Вістар через чотири шари нейлонової сітки у середовище RPMI-1640 рН 7,4. Отриману суспензію центрифугували (600 г, 10 хв), а осад клітин ресуспендували до концентрації $2-5 \cdot 10^6$ кл/мл.

Клітини лінії L1210 (лімфоїдної лейкемії) й асцитної карциноми Ерліха (АКЕ) (рак молочної залози) отримували з банку клітинних ліній Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології імені Р. Є. Кавецького НАН України. Клітини L1210 прищеплювали мишам гібридів F_1 DBA2, а клітини АКЕ — безпородним мишам масою 20 г. При роботі з тваринами дотримувалися Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин.

Кількість клітин підраховували за допомогою мікроско-

па «ЛОМО» Р12 (РФ) у камері Горяєва з використанням 0,4%-го розчину трипанового синього.

Стабільні водні колоїдні розчини фулеренів C_{60} (чистота більше 99,5 %) отримано у хімічній лабораторії Технічного університету м. Ільменау (ФРН) [11].

Клітини ($0,5-2 \cdot 10^6$ кл/мл) інкубували впродовж 1 год при температурі 37°C у середовищі RPMI-1640 за відсутності фулерену C_{60} або за його присутності у кінцевій концентрації 10^{-5} М. Після цього клітини осаджували (600 г, 5 хв), переводили у 10 мМ трис-НСІ буфер (рН 8,0) і заморожували у скрапленому азоті. Після розморожування лізат обробляли у гомогенізаторі Поттера, отриманий після центрифугування (1500 г, 15 хв) супернатант (клітинний екстракт) використовували для спектрофотометричного визначення ензиматичної активності.

Активність СОД визначали за здатністю ензиму інгібувати реакцію відновлення нітросинього тетразолію (НСТ) [12], активність ГП — за нагромадженням окисненого глутатіону (GSSG), утвореного при нейтралізації H_2O_2 [13], активність ГТ — за швидкістю утворення кон'югата глутатіону з 1-хлор-2,4-динітробензолом [13].

Кількість білка оцінювали за методом Бредфорд.

Розрахунки, статистичну обробку даних і побудову графіків проводили на IBM PC з використанням загальноприйнятих методів варіаційної статистики та спеціалізованих прикладних програм Excel і Origin.

Результати дослідження та їх обговорення

Представником першої лінії антиоксидантного захисту є СОД, яка здійснює реакцію дисмутації супероксидних аніон-радикалів, перетворюючи їх на менш реакційно здатні молекули H_2O_2 . На рис. 1 наведено кінетику реакції відновлення НСТ у контролі (без білка) та за умови внесення у пробу клітинних екстрактів (100 мкг білка). Лінійна залежність відновлення НСТ спостерігається у часовому діапазоні до 2 хв, після чого криві виходять на плато. У разі внесення екстрактів клітин L1210 і АКЕ ступінь пригнічення реакції відновлення НСТ є більшою (у 2,1 та 1,7 разу відповідно), ніж у разі внесення екстракту тимоцитів (у 1,2 разу). Відомо, що СОД конкурує з індикаторною молекулою — нітросинім тетразолієм за супероксидний аніон-радикал, тому що більше пригнічується відновлення НСТ, то вищою є супероксиддисмутазна активність препарату. Отримані дані вказують, що супероксиддисмутазна активність транс-

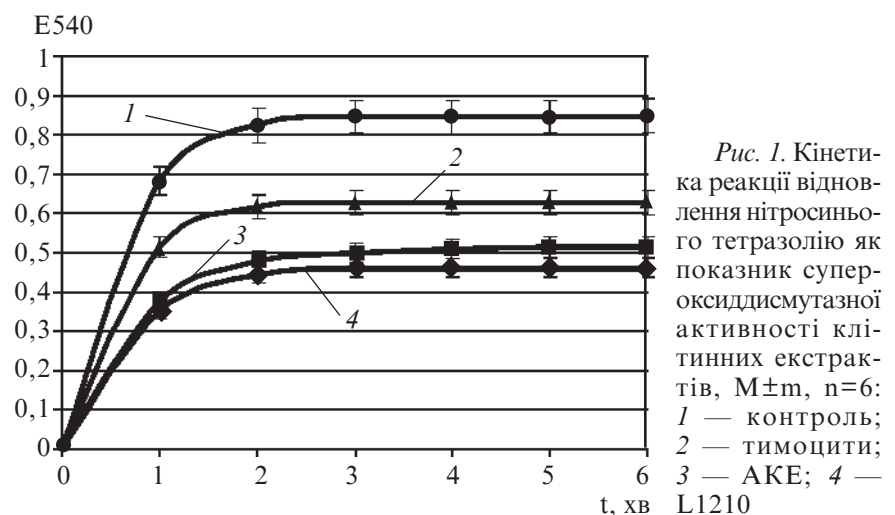
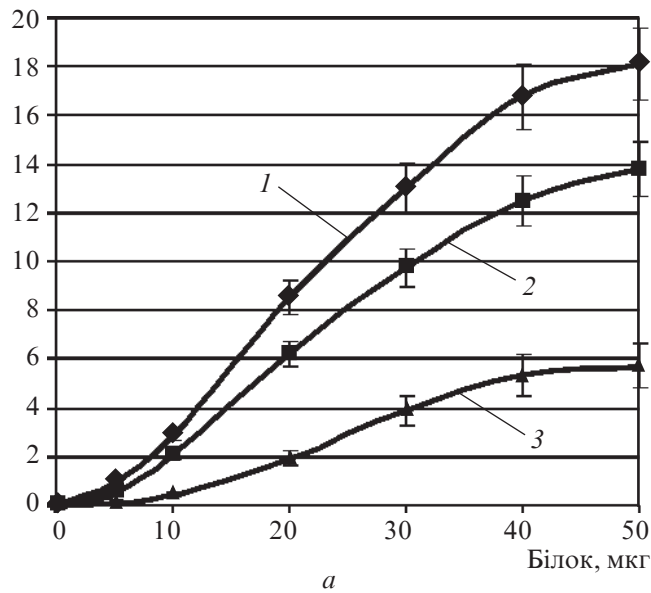


Рис. 1. Кінетика реакції відновлення нітросинього тетразолію як показник супероксиддисмутадної активності клітинних екстрактів, $M \pm m$, $n=6$: 1 — контроль; 2 — тимоцити; 3 — АКЕ; 4 — L1210

мкмоль GSSG / хв



нмоль глутатіонового кон'югату / хв

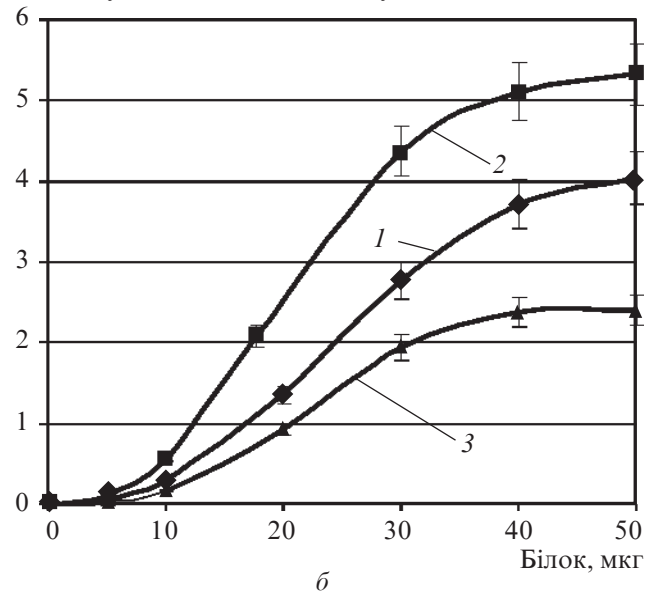


Рис. 2. Залежність швидкості глутатіонпероксидазної (а) та глутатіонтрансферазної (б) реакції від концентрації білка, $M \pm m$, $n=6$: 1 — L1210; 2 — АКЕ; 3 — тимоцити

формованих клітин L1210 і АКЕ є вищою, ніж у нормальних Т-клітин.

Для кількісної оцінки величини супероксиддисмутазної активності клітинних екстрактів реакцію проводили впродовж 2 хв, тобто за умови розвитку її початкової швидкості.

Важливу роль у знешкодженні АФК у клітині відіграє глутатіон-залежна АОС. Глутатіонпероксидаза каталізує відновлення утвореного у супероксиддисмутазній реакції H_2O_2 до води, а органічних гідропероксидів — до гідросполук і перериває ланцюгові реакції внутрішньоклітинного переокиснення. Таким чином, ГП запобігає нагромадженню токсичних вторинних продуктів пероксидації, але не забезпечує їх знешкодження. Цю функцію виконує інший ензим глутатіон-залежної АОС — ГТ, яка забезпечує кон'югацію глутатіону з електрофільними субстратами — продуктами пероксидного окиснення ліпідів, а також використовує глутатіон (GSH) для утворення змішаних дисульфідів з окисненими SH-групами білків та їх подальшого відновлення.

На рис. 2 подано залежність швидкості глутатіонпероксидазної (а) та глутатіонтрансферазної (б) реакцій від концентрації білка клітинного екстракту у пробі. Лінійний приріст швидкості реакції спостерігається за підвищення вмісту білка до 30 мкг. Слід зазначити, що рівень продуктів, нагромаджених як у глутатіонпероксидазній, так і глутатіонтрансферазній реакціях, був вищим у разі внесення у пробу екстрактів трансформованих клітин.

Для кількісної оцінки величини активності глутатіон-залежних ензимів у пробі вносили 25 мкг білка клітинних екстрактів.

Дані щодо розрахованої питомої активності АОЕ у досліджуваних клітинах наведено у табл. 1. У трансформованих клітинах L1210 і АКЕ активність антиоксидантних ензимів була вищою, порівняно з тимоцитами: активність СОД — у 3,9 та 3,6 разу, активність ГП — у 3,1 та 2,9 разу, а ГТ — у 1,9 та 2,5 рази відповідно.

Таблиця 1

Супероксиддисмутазна, глутатіонпероксидазна та глутатіонтрансферазна активність екстрактів тимоцитів, клітин L1210 та АКЕ у контролі та за умови преінкубації з фулереном C_{60} (10^{-5} M), $M \pm m$, $n=5$

Тип клітин	Ензиматична активність		
	супероксиддисмутазна, ум. од./мг білка	глутатіонпероксидазна, мкмоль GSSG/(мг білка · хв)	глутатіонтрансферазна, нмоль кон'югату/(мг білка · хв)
Тимоцити	$2,91 \pm 0,10$	$98,80 \pm 5,50$	$41,90 \pm 2,07$
+ C_{60}	$2,45 \pm 0,09$	$81,00 \pm 3,40$	$44,10 \pm 2,09$
L1210	$11,31 \pm 0,54$	$307,80 \pm 9,24$	$81,30 \pm 3,72$
+ C_{60}	$6,02 \pm 0,31^*$	$306,10 \pm 9,45$	$86,58 \pm 3,48$
АКЕ	$10,51 \pm 0,45$	$288,30 \pm 8,90$	$106,00 \pm 4,75$
+ C_{60}	$12,35 \pm 0,58$	$278,60 \pm 4,10$	$111,30 \pm 5,47$

Примітка. * — $p < 0,05$ порівняно з пробую, інкубованою без C_{60} .

Відомо, що АФК здатні активувати низку кіназ, фосфатаз і транскрипційних факторів та діяти як вторинні месенджери, що прискорюють клітинну проліферацію. Посилена генерація АФК у трансформованих клітинах — це ендогенне джерело ДНК-ушкоджувальних агентів, які спричиняють генетичну нестабільність і прискорюють малігнізацію. Так, показано пригнічення динаміки пухлинної трансформації клітин у разі посилення експресії СОД [4].

Низька активність АОЕ характерна для малодиференційованих клітин, що швидко проліферують, а також для первинних ракових клітин, яким властива висока швидкість поділу. Це пов'язано зі здатністю АФК активувати низку кіназ, фосфатаз і транскрипційних факторів та діяти як вторинні месенджери, що прискорюють клітинну проліферацію.

Активність АОЕ може змінюватись у процесі набуття клітиною злоякісного фенотипу. Підвищену активність АОС виявлено у багатьох малігнізованих клітинах. У хворих на лейкемію показано підвищене продукування супероксиданіона лейкоцитами на фоні підвищеної супероксиддисмутази та глутатіонпероксидази активності, що свідчить про м'який оксидативний стрес [5]. Супероксиддисмутазна активність підвищена, зокрема, у клітинах ниркової аденокарциноми [6] та колоректального раку [7] порівняно з гістологічно незміненою тканиною, а також у андроген-нечутливих малігнізованих клітинах простати РС-3 та DU145 [8]. При дослідженні загальної супероксиддисмутази активності й активності мітохондріальної MnСОД у клітинних лініях панкреатичної аденокарциноми встановлено, що показники залежать від ступеня диференціації клітин і є значно вищими у диференційованих метастазуючих клітинах

Сапан 1 порівняно з показниками у нормальних первинних культурах [4]. Припускають, що посилення антиоксидантної активності є не лише адаптацією до стресу, але й однією з умов виникнення стійкості трансформованих клітин до лікарських препаратів.

Оскільки АОЕ відіграють важливу роль у канцерогенезі та забезпеченні життєздатності трансформованих клітин, не виключено, що шляхом модуляції антиоксидантно-прооксидантної рівноваги можна впливати на ці процеси. У зв'язку з цим нами було досліджено активність АОЕ у клітинах, що були преінкубовані з фулереном C_{60} упродовж 1 год. Згідно з даними літератури, час, необхідний для проникнення фулерену C_{60} і його похідних через плазматичну мембрану та нагромадження всередині клітин різних типів, коливається від 30 хв до 4 год [14].

Преінкубація з фулереном C_{60} не впливала на активність АОЕ у тимоцитах і клітинах АKE, але призводила до вірогідного (на 55,4 %, див. табл. 1) зниження активності СОД у клітинах L1210.

Виявлена вибірковість дії фулерену C_{60} свідчить скоріше не про безпосередню взаємодію наночастинок з ензимами, а про втручання фулерену у процес продукування АФК у клітинах. Відомо, що фулерен C_{60} є вловлювачем АФК, зокрема супероксиданіона. Молекулярними механізмами реалізації антиоксидантної дії фулерену є або безпосередня взаємодія O_2^- з системою висококон'югованих подвійних зв'язків з утворенням радикала C_{60}^- , або каталітична дисмутація супероксиданіона на поверхні наночастинок, що показано, зокрема, для мономалоніл-похідного C_{60} , яке розглядають як міметик СОД [15]. Пригнічення активності СОД у преінкубованих з C_{60} клітинах L1210 може бути спричинене

зниженням вмісту АФК у клітинах за дії C_{60} і, як наслідок, зниження експресії СОД як індукційного ензиму. Такі властивості фулеренів C_{60} указують на можливість їх використання для контролювання внутрішньоклітинної прооксидантно-антиоксидантної рівноваги у трансформованих клітинах.

Висновки

Показано, що трансформовані клітини лімфоїдного лейкозу L1210 і асцитної карциноми Ерліха характеризуються вищим рівнем активності СОД, ГП, ГТ порівняно з нормальними попередниками Т-лімфоцитів. Виявлено зниження супероксиддисмутази активності у клітинах L1210 після їх преінкубації з фулереном C_{60} , що вказує на можливість використання цих вуглецевих наноструктур для модуляції активності АОС у трансформованих клітинах.

Робота виконана за підтримки гранту НАН України № 0110U005962.

ЛІТЕРАТУРА

1. Gamaley I. A. Roles of reactive oxygen species: signaling and regulation of cellular functions / I. A. Gamaley, I. V. Klyubin // *International Review of Cytology*. – 1999. – Vol. 188. – P. 203–255.
2. Бурлака А. П. Радикальні форми кисню та оксиду азоту при пухлинному процесі / А. П. Бурлака, Є. П. Сидорик. – К.: Наук. думка, 2006. – 227 с.
3. Лю Б. Н. Старение, возрастные патологии и канцерогенез / Б. Н. Лю. – Алматы: Казахстанский НТУ. – 2003. – С. 209–220.
4. The role of magnese superoxide dismutase in the growth of pancreatic adenocarcinoma / J. Cullen, C. Weydert, M. Hinchouse [et al.] // *Cancer Research*. – 2003. – Vol. 63. – P. 1297–1303.
5. Free radicals antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different types of leukemias / G. Sandhya Devi, M. Hema Prasad, I. Saraswathi [et al.] // *Clinica Chimica Acta*. – 2000. – Vol. 293, Is. 1–2. – P. 53–62.
6. Oberley T. Antioxidant enzyme levels in cancer / T. Oberley, L. Oberley // *Histol. Histopathol.* – 1997. – Vol. 12 (2). – P. 525–535.

7. *Antioxidant status and lipid peroxidation in colorectal cancer* / E. Skrzydewska, A. Stankiewicz, M. Sulikowska [et al.] // *Mediators of inflammation*. – 2005. – P. 233–234.

8. *Antioxidant enzymes in malignant prostate cell lines and in primary cultured prostatic cells* / K. Jung, B. Seidel, B. Rudolph [et al.] // *Free Radical Biology and Medicine*. – 1997. – Vol. 23, Is. 1. – P. 127–133.

9. *Cellular localization of a water-soluble fullerene derivative* / S. Foley, C. Crowley, M. Smahli [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2002. – Vol. 294. – P. 116–119.

10. *Biological effects of C₆₀ fullerenes in vitro and in a model system* / S. V. Prylutska, O. P. Matyshevska, I. I. Grynyuk [et al.] // *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* – 2007. – Vol. 468. – P. 265–274.

11. *Structure of C₆₀ fullerene in water: spectroscopic data* / P. Scharff, K. Risch, L. Carta-Abelmann [et al.] // *Carbon*. – 2004. – Vol. 42. – P. 1203–1206.

12. *Чевари С. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах* / С. Чевари, И. Чаба, Й. Секей // *Лабораторное дело*. – 1985. – № 12. – С. 678–681.

13. *Власова С. Н. Активность глутатион-зависимых ферментов эритроцитов при хронических заболеваниях печени у детей* / С. Н. Власова, Е. И. Шабунина, И. А. Переслегина // *Там же*. – 1990. – № 8. – С. 19–22.

14. *C₆₀-Fullerenes: detection of intracellular photoluminescence and lack of cytotoxic effects* / N. Levi, R. Hantgan, M. Lively [et al.] // *Journal of Nanobiotechnology*. – 2006. – Vol. 4. – P. 14.

15. *A biologically effective fullerene (C₆₀) derivative with superoxide dismutase mimetic properties* / S. Ali, J. Hardt, K. Quick [et al.] // *Free Radical Biology & Medicine*. – 2004. – Vol. 37, N 8. – P. 1191–1202.

УДК 577.152.3+616+546

І. І. Гринюк, С. В. Прилуцька, С. М. Гребіник, А. Г. Михайлова, Д. В. Франкевич, О. П. Матишевська
ПОКАЗНИКИ АКТИВНОСТІ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ У НОРМАЛЬНИХ І ТРАНСФОРМОВАНИХ КЛІТИНАХ

Показано, що у трансформованих лімфоцитах (лейкоз L1210) і клітинах асцитної карциноми Ерліха активність супероксиддисмутаз, глутатіонтрансферази та глутатіонпероксидази є вищою, ніж у нормальних Т-лімфоцитах (ізолювані тимоцити щура). У разі обробки клітин L1210 фулереном C₆₀ (10⁻⁵ М) виявлено зниження супероксиддисмутазної активності, що свідчить про здатність фулерену C₆₀ модифікувати антиоксидантну активність трансформованих клітин.

Ключові слова: тимоцити, клітини L1210, асцитна карцинома Ерліха, супероксиддисмутаза, глутатіонпероксидаза, глутатіон-S-трансфераза, фулерен C₆₀.

UDC 577.152.3+616+546

I. I. Grynyuk, S. V. Prylutska, S. M. Grebinyk, A. G. Mykhailova, D. V. Franskevich, O. P. Matyshevska
PARAMETERS OF ANTIOXIDANT ACTIVITY IN NORMAL AND TRANSFORMED CELLS

Activity of superoxide dismutase (SOD) and glutathione-dependent enzymes — peroxidase and transferase are shown to be increased both in transformed lymphocytes (leucosis L1210) and Erlich ascitic carcinoma cells as compared with normal T-lymphocytes (isolated rat thymocytes). Treatment of L1210 cells with 10⁻⁵ M fullerene C₆₀ was followed by decrease of SOD activity, indicating on ability of fullerene C₆₀ to modify antioxidant activity of transformed cells.

Key words: thymocytes, L1210 cells, ACE, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase, fullerene C₆₀.

УДК 616.441-008.61:612.465:614.449

А. В. Скрипніченко

ЕФЕКТИВНІСТЬ ЗАСТОСУВАННЯ КАПТОПРИЛУ ДЛЯ КОРЕКЦІЇ МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ГІПЕРТИРЕОЇДНОЇ НИРКИ У ЩУРІВ

Одеський національний медичний університет

Вступ

Останніми роками вивчення патології щитоподібної залози, зокрема гіпертиреозу, та можливості її корекції з кожним днем набувають усе більшої актуальності, тому що в Україні проблеми, пов'язані з цією патологією, стрімко поширюються серед населення як дорослого, так і дитячого віку [1]. У патогенезі гіпертиреозу важливу роль відіграють не

тільки патологічні зміни щитоподібної залози, але й дисфункція інших внутрішніх органів. У першу чергу, заслуговують на увагу та потребують ретельного вивчення морфофункціональні особливості нирок, які є еферентною ланкою у підтримці водно-сольової та кислотно-лужної рівноваги, головним органом виділення проміжних продуктів обміну, які утворюються в організмі при тиреотоксикозі. Відомо,

що на фоні гіпертиреоїдного статусу організму спостерігається активізація основних компонентів ренін-ангіотензинової системи (РАС): підвищення біосинтезу ангіотензиногену, стимуляція активності реніну плазми крові, ріст експресії АТ1 субпопуляції рецепторів ангіотензину-II в нирках і серці [2; 3]. У дослідженнях *in vitro* доведено, що тиреоїдні гормони безпосередньо стимулюють біосинтез і секрецію