

Н. М. Кононенко

ОСОБЛИВОСТІ СТАНУ АНТИОКСИДАНТНИХ ФЕРМЕНТІВ ЕРИТРОЦИТІВ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ ГАСТРАЛЬНОЇ ВИРАЗКИ

Національний фармацевтичний університет МОЗ України, Харків

Вступ

Окисно-відновні процеси в організмі є важливою частиною будь-якої ланки метаболізму і необхідні як для забезпечення енергетичних потреб, так і для постачання й утилізації кисню в тканинах. Ці процеси в організмі контролюються різними регуляторними системами з метою підтримки збалансованої взаємодії реакцій утворення продуктів окисації, а також механізмів контролю, що призводять до їхнього гальмування при надлишковій активності реакцій антиоксидації.

У нормально функціонуючих клітинах вміст продуктів вільнорадикального окиснення перебуває на надзвичайно низькому рівні, незважаючи на достатню кількість субстратів ПОЛ. Це свідчить про досить могутню антиоксидантну захисну систему. Відомо, що в цитоплазмі еритроцитів наявні такі ферменти антиоксидантного захисту (АОЗ), як супероксиддисмутаза, що містить мідь та цинк (CuZn-супероксиддисмутаза, КФ 1.15.1.1), каталаза (КАТ, КФ 1.11.1.6), глутатіонпероксидаза (ГП, КФ 1.11.1.9), глутатіонредуктаза (ГР, КФ 1.6.4.2), відновлений глутатіон (GSH) [1].

Однак їх роль як ферментів антиоксидантного захисту при виразковій хворобі шлунка не вивчена. Як відомо, у розвитку і загостренні виразкової хвороби важливе значення належить активізації ПОЛ, при цьому еритроцити стають мішенню «окисного стресу» [2].

Саме тому **метою** даної роботи стало дослідження антиоксидантного захисту еритроцитів у тварин із експериментальною гастральною виразкою.

Матеріали та методи дослідження

Експерименти проведені на 80 статевозрілих нелінійних самцях білих щурів масою (180±20) г. Тварин утримували в умовах віварію при сталій температурі та вологості повітря. Усі маніпуляції на тваринах проводили під гексеналовим наркозом (60 мг/кг підшкірно), згідно з Міжнародними принципами Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують для експериментів та інших наукових цілей (Страсбург, 18.03.86). Щури були розподілені на дві групи. У першу групу ввійшли інтактні тварини (n=10), які знаходилися на звичайному раціоні віварію. Другу групу склали щури (n=70) з моделлю хронічної виразки шлунка за Окабе [3]. Протягом 24 год тварини голодували з вільним доступом до води, після чого їм проводили лапаротомію та виводили шлунок. На серозну оболонку передньої стінки тіла шлунка накладали металеву формовку з внутрішнім діаметром 5–6 мм, всередину якої вносили 0,1 мл льодяної оцтової кислоти на 60 с. Місце впливу осушували фільтрувальним папером. Через 24 год на ділянці нанесення кислоти з боку слизової оболонки виникала експериментальна виразка. Частині тварин (n=10) після

розвитку експериментальної моделі на 5-ту добу досліду проводили евтаназію шляхом передозування ефірного наркозу. Шлунок розтинали за великою кривизною та промивали ізотонічним розчином натрію хлориду при температурі 37 °С. Проводили макроскопічну оцінку отриманого препарату з визначенням глибини та площі виразкового дефекту з подальшим розрахунком виразкового індексу (VI) за формулою:

$$VI = \frac{P \cdot N}{100},$$

де P — ступінь виразки, N — % тварин із виразками.

Кров для визначення кількості еритроцитів, лейкоцитів і ферментів АОЗ у тварин контрольної та дослідної груп брали з хвостової вени також на 5-ту добу експерименту, оскільки завдяки раніше проведеним дослідженням нами встановлено, що реакція запалення при оцтовій виразці шлунка в цей час досягає максимуму. Еритроцити підраховано в лічильній камері Горяєва. Лейкоцитарну формулу вивчали за допомогою апарата "Hematrak" фірми "Opton" (Німеччина). Еритроцити видаляли шляхом подвійного відмивання холодним фізіологічним розчином. Активність супероксиддисмутази встановлено за допомогою реакції відновлення нітратетразолію синього до нітроформазану [4], каталази — з використанням реакції H₂O₂ з амонієм молібдатом [5]. Для визначення активності глутатіонпероксидази та вмісту глута-



Кількість еритроцитів і показники лейкоцитарної формули крові щурів при експериментальній гастральній виразці, $\bar{X} \pm x$, n=10

Умови досліджу	Виразковий індекс	Еритроцити, млн/мкл	Лейкоцити, тис./мкл	Види лейкоцитів, %				
				нейтрофіли	еозинофіли	базофіли	моноцити	лімфоцити
Інтактні тварини (контроль)	0	7,5±0,4	11,8±0,6	57,0±0,9	2,0±0,3	1,0±0,2	4,0±0,4	36,0±1,7
Тварини з виразкою шлунка	3,6	7,8±0,3	16,1±0,8*	83,0±1,0*	3,0±0,2	1,0±0,4	3,0±0,3	30,0±0,6

Примітка. У табл. 1 і 2: * — $P < 0,05$ щодо інтактної групи тварин.

тіону застосовували метод, принцип якого базується на реакції сульфгідрильних груп із реактивом Елмана (5,5'-дитіобіс(2-нітробензойна кислота)) [6]. Активність глутатіон-редуктази характеризували за зменшенням вмісту НАДФ·Н [7]. Вміст гемоглобіну досліджували геміглобінціанідним методом [8].

Статистичну обробку отриманих результатів проведено з використанням t-критерію Стьюдента. Вірогідними вважалися результати при $P < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення

При макроскопічному вивченні шлунка дослідних тварин було виявлено гіперемію оточуючих виразку тканин і їх набряк, численні геморагії, що свідчить про розвиток реакції запалення. Виразки мали округлу форму, рівні краї, діаметр (4,3±0,5) мм, глибину (1,3±0,2) мм, що відповідає виразковому індексу 3,6 і свідчить про розвиток деструктивних процесів у слизовій оболонці шлунка.

Як відомо, ендогенно вільні радикали утворюються в результаті респіраторного вибуху фагоцитуючих клітин [9]. Зокрема нейтрофіли містять НАДФН-оксидазну систему і велику кількість мієлопероксидази, яка каталізує реакцію між іоном хлору і перекисом водню. У НАДФН-оксидазній системі одноелектронним перенесенням із ФАДН на моле-

кулярний кисень утворюється супероксиданіонрадикал і семіхінонна форма ФАДН, яка через убіхінон передає електрон на цитохром В, що також продукує супероксиданіонрадикал. Утворення активних форм кисню проявляється у вигляді дихального сплеску нейтрофілів, при цьому викид активних форм кисню НАДФН-оксидазної системи збільшується в 10–70 разів [9]. Усі компоненти клітини — ліпіди, білки, вуглеводи і нуклеїнові кислоти — можуть бути ушкоджені вільними радикалами, що спричиняє серйозний розлад клітинного метаболізму і структури клітин.

Тому наступним етапом нашого дослідження стало вивчення вмісту нейтрофілів у периферичній крові (як найбільш активних фагоцитуючих клітин) і еритроцитів (як мішеней «окисного стресу»).

У ході експерименту нами виявлено, що при розвитку виразкової хвороби в крові у тварин спостерігається збільшення

вмісту нейтрофілів (табл. 1), що підтверджує їхню активність в зоні виразкового дефекту шлунка. При цьому кількість еритроцитів у щурів із експериментальною виразкою вірогідно не відрізнялася від показника у контрольних тварин (див. табл. 1). Отже, можна було б висловити припущення, що в гострому періоді виразкової хвороби еритроцити ще не є мішенями «окисного стресу». Однак при вивченні активності антиоксидантних ферментів еритроцитів нами встановлена зміна їх активності (табл. 2).

Найбільш виражені зміни нами було виявлено у супероксиддисмутази і каталази (активність СОД вірогідно підвищувалася в 2,1 разу порівняно з контрольною групою тварин, активність КАТ знижувалася в 1,5 разу).

Отримані дані підтвердили тезу, що CuZn-супероксиддисмутаза забезпечує видалення з еритроцитів за допомогою реакції дисмутації супероксидного аніон-радикала з утво-

Таблиця 2

Активність ферментів антиоксидантного захисту в еритроцитах щурів із гастральною виразкою, $\bar{X} \pm x$, n=10

Умови досліджу	CuZn-СОД, ум. од./мг	КАТ, мкмоль/(хв·мг) Нв	ГП, мкмоль GSH/(хв·мг) Нв	ГР, нмоль НАДФ·Н/(хв·мг) Нв	GSH, нмоль/мг Нв
Інтактні тварини (контроль)	2,3±0,1	2,4±0,2	686,3±5,7	3,97±0,30	4,7±0,3
Тварини з виразкою шлунка	4,8±0,2*	1,6±0,1*	877,6±5,0*	5,6±0,2*	1,5±0,2*



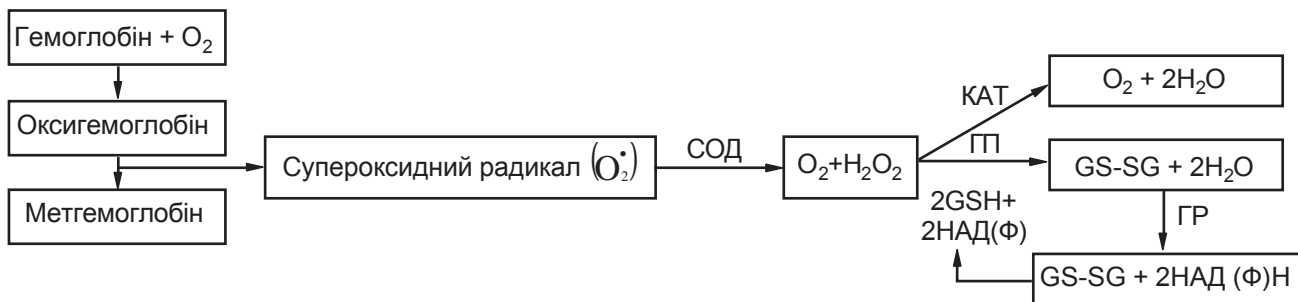


Рисунок. Механізм дії антиоксидантних ферментів еритроцитів при утворенні активних форм кисню

ренням перекису водню і молекулярного кисню, а каталаза розкладає перекис водню, що утворився, до кисню і води (рисунок). Супероксиддисмутаза не тільки є могутнім інгібітором окисних процесів, вона також запобігає лізису еритроцитів і бере участь у підтримці стабільності мембрани і форми еритроцитів. Зниження активності каталази, на наш погляд, може бути пов'язане з інактивацією її перекисом водню, що надмірно виробляється СОД, активність якої збільшується в цей час.

Виразкове ураження слизової оболонки шлунка істотно позначається на стані глутатинової системи. Вміст відновленого глутатіону порівняно з подібним явищем у інтактних тварин був знижений у 3,1 разу. Це пов'язано, очевидно, з посиленням використання відновленого глутатіону для детоксикації різних перекисів, які утворюються у великих кількостях. Збільшена витрата відновленого глутатіону пов'язана також із підвищенням активності глутатіонпероксидази, що каталізує відновлення перекису водню та органічних перекисів з використанням відновленого глутатіону.

Регенерація відновленого глутатіону, необхідного для детоксикації перекисів, відбувається за участі ферменту глутатіонредуктази, що використовує для своєї роботи НАДФН. Отже, підвищення активності глутатіонредуктази в 1,4 разу є певним доказом

компенсаторного підвищення цього ферменту, якого, однак, недостатньо для підтримки нормального рівня відновленого глутатіону.

Висновки

1. При виразковій хворобі шлунка в еритроцитах порушене функціонування антиоксидантного захисту з пригніченням активності більшої частини ферментів.

2. Підвищення активності супероксиддисмутази — головного антиоксидантного ферменту — є компенсаторно-приспосовальною реакцією у відповідь на надлишкове утворення супероксидних радикалів, джерелом яких є нейтрофіли.

ЛІТЕРАТУРА

1. Барабой В. А., Сутковой Д. А. Окислительно-антиоксидантный гомеостаз в норме и патологии. Ч. 2. / Под ред. Ю. А. Зозули. — К.: Черновобильинтеринформ, 1997. — 220 с.

2. Зборовская И. А., Банникова М. В. Антиоксидантная система организма, ее значение в метаболизме. Клинические аспекты // Вестник Рос. Академии мед. наук. — 1995. — № 6. — С. 53-60.

3. Okabe S., Roth J. L. A., Pfeiffer C. J. A method for experimental, penetrating gastric and duodenal ulcer in rats // Digestive Diseases. — 1971. — Vol. 16, N 3. — P. 277-284.

4. Чевари С., Чаба И., Секей Й. Роль супероксиддисмутази в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах // Лаб. дело. — 1985. — № 11. — С. 678-681.

5. Дослідження пероксидної окисдації ліпідів та антиоксидантного захисту організму в клінічній практиці: Метод. рекомендації. — Л., 2002. — 20 с.

6. Мальцев Г. Ю., Тышко Н. В. Методы определения содержания глутатиона и активности глутатионпероксидазы в эритроцитах // Гигиена и санитария. — 2002. — № 2. — С. 69-72.

7. Юсупова Л. Б. О повышении точности определения активности глутатионредуктазы эритроцитов // Лаб. дело. — 1989. — № 4. — С. 19-21.

8. Меньшиков В. В. Лабораторные методы исследования в клинике. — М.: Медицина, 1987. — С. 107-108.

9. Цебржинский О. И. Некоторые аспекты антиоксидантного статуса // Физиология и патология перекисного окисления липидов, гемостаза и иммуногенеза. — Полтава, 1992. — С. 120-142.

