

2. Wallace K. B., Starkov A. A. Mitochondrial targets of drug toxicity // *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.* — 2000. — N 40. — P. 353-388.
3. Bernardi P. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition // *Physiol Rev.* — 1999. — N 79. — P. 1127-1155.
4. Beavis A. D. Properties of the inner membrane: anion channel in intact mitochondria // *J. Bioenerg Biomembr.* — 1992. — N 24. — P. 77-90.
5. p53 and tumor necrosis factor regulate the expression of a mitochondrial chloride channel protein / E. Fernandez-Salas, M. Sagar, C. Cheng et al. // *J. Biol. Chem.* — 1999. — N 274. — P. 36488-36497.
6. Wojtczak L., Wieckowski M. R. The mechanisms of fatty acid-induced proton permeability of the inner mitochondrial membrane // *J. Bioenerg. Biomembr.* — 1999. — N 31. — P. 447-455.
7. Palmieri F. Mitochondrial carrier proteins // *FEBS Lett.* — 1994. — N 346. — P. 48-54.
8. Mitochondrial substrate carriers / F. Palmieri, F. Bisaccia, V. Iacobazzi et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1992. — N 1101. — P. 223-227.
9. Sluse F. E. Mitochondrial metabolite carrier family, topology, structure and functional properties: an overview // *Acta Biochim. Polon.* — 1996. — N 43. — P. 349-360.
10. Bax directly induces release of cytochrome C from isolated mitochondria / J. M. Jurgensmeier, Z. Xie, Q. Deveraux et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1998. — N 95. — P. 4997-5002.
11. Doran E., Halestrap A. P. Cytochrome C release from isolated rat liver mitochondria can occur independently of outer-membrane rupture; possible role of contact sites // *Biochem. J.* — 2000. — N 348. — P. 343-350.
12. Marzo I., Brenner C., Kroemer G. The central role of the mitochondrial inegachannel in apoptosis: evidence obtained with intact cells, isolated mitochondria, and purified protein complexes // *Biomed. Pharmacother.* — 1998. — N 52. — P. 248-251.
13. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death // *Biochem. J.* — 1999. — N 341. — P. 233-249.
14. Годован В. В., Кресюн В. Й. Вплив магнієвої солі дифосфонату германію на активність АТФ-аз мітохондрій міокарда при експериментальній міокардіодистрофії // *Досягнення біології та медицини.* — 2006. — № 1. — С. 24-29.
15. Кресюн В. Й. Регуляція окислительного фосфорилування як один из возможных путей нормализации метаболизма мозга при стрессе // *Бюлл. эксперим. биол.* — 1983. — Т. 96, № 12. — С. 37-40.
16. Umbreit W. W., Burris R. H., Stauffer J. F. *Manometric in biochemical techniques* — Minneapolis, 1972. — 120 p.
17. Сумихатова О. А., Чулановская М. В. Манометрические методы изучения дыхания и фотосинтеза растений. — М.; Л.: Наука, 1965. — 168 с.
18. Lowry O. H., Lopez J. A. Determination of inorganic phosphate in the presence of labeling ester // *J. Biol. Chem.* — 1946. — Vol. 162, N 2. — P. 421-433.
19. Скулачев В. Н. Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи. — М.: Изд-во АН СССР, 1962. — 156 с.

УДК 577.07.003.121+611.018.4

А. П. Левицький, О. А. Макаренко, І. В. Ходаков, Ю. В. Зеленіна

ФЕРМЕНТАТИВНИЙ МЕТОД ОЦІНКИ СТАНУ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ

Інститут стоматології АМН України, Одеса

Кісткова тканина приблизно на 35 % складається з органічного матриксу, представлено-го на 90 % колагеном I типу — основою для мінералізації [1; 2]. Здорова кісткова тканина — це динамічна система, що постійно оновлюється завдяки ремоделюванню — взаємозалежним і чітко скоординованим процесам резорбції й формування кістки. При патології спостерігається перевага одного з процесів, найчастіше резорбції, що призводить до чималих утрат кісткової маси

[2; 3]. Початковою подією в кістковому ремоделюванні є момент, коли остеокласти виділяють лізосомальні ферменти (кислу фосфатазу та кислі протеази), цитрат, H⁺ і протеази типу колагенази. Кислі фосфатази розчиняють гідроксиапатит, а протеази руйнують органічний матрикс кісткової тканини [1–3].

Сьогодні у провідних клінічних лабораторіях застосовують низку біохімічних методів з метою вивчення обмінних процесів у кістковій тканині.

Так, основними показниками інтенсивності утворення кістки прийнято вважати лужну фосфатазу, остеокальцин, пропептиди проколагену в сироватці крові. Як специфічні маркери резорбції кістки використовують показники вмісту гідроксипроліну, галактозилгідроксилізіну, піридиноліну в сечі, добової екскреції кальцію, а також активності тартратрезистентної кислоти фосфатази в сироватці крові [4–7]. Однак досі не розроблений біохімічний показник метаболізму



кісткової тканини, наближений до ідеального [4].

Необхідно звернути увагу на те, що якщо в клініці існують методи визначення стану білкового метаболізму в кістковій тканині (остеокальцин, пропептиди проколагену в сироватці та гідроксипроліну, галактозилгідроксилізіну, піридиноліну в сечі), то експериментальні методи дослідження безпосередньо кісткової тканини обмежуються тільки показниками мінерального обміну. Так, підвищений вміст кальцію і неорганічних фосфатів на фоні високої активності лужної фосфатази в кістковій тканині трактують як нормальну функціональну активність остеобластів й інтенсивність процесів мінералізації. Прийнято також вважати, що підйом активності кислої фосфатази на фоні низького вмісту кальцію і неорганічних фосфатів у кістковій тканині свідчать про патологічну активацію процесів резорбції кістки. Тим часом, на наш погляд, бажано в експериментальних дослідженнях вивчати білковий обмін у кістках і, зокрема, стан протеолізу в кістковій тканині. Цій меті присвячена дана робота.

Матеріали та методи дослідження

У роботі наведено аналіз результатів чотирьох експериментів на лабораторних щурах лінії Вістар стадного розведення, самцях і самках. У першому експерименті вивчали вікові особливості досліджуваних самців у період з 1,5 до 24 міс. У решті експериментів відтворювали моделі остеопорозу (ОП): 1) преднізолоновий — на самцях шляхом введення преднізолону з питною водою дозою 5 мг/кг протягом місяця [6]; 2) постменопаузальний — шляхом двосторонньої овариоектомії у самок протягом місяця [7; 8] і 3) за допомогою аліментарного обмеження кальцію, фосфо-

ру і незамінних амінокислот у 17-місячних самок протягом 4 міс [8]. У кожному експерименті брали участь тварини контрольної групи без моделювання патології та дослідної — з моделлю ОП. Після завершення експериментів щурів піддавали етаназії під тіопенталовим наркозом, виділяли стегнові кістки для дослідження щільності [9]. У гомогенатах великих гомілкових кісток визначали сумарну або загальну протеолітичну активність (ЗПА) за гідролізом казеїну [10], активність еластази (Е) [11], а також активність кислої та лужної фосфатази (КФ і ЛФ відповідно) [12]. Потім за усередненими значеннями активності ферментів розраховували коефіцієнти ЗПА/Е і ЛФ/КФ. Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням t-критерію Стьюдента [13].

Результати дослідження та їх обговорення

На рисунку подаються вікова динаміка показників щільності стегнових кісток самців щурів, коефіцієнти ЗПА/Е і ЛФ/КФ кісткової тканини гомілкових кісток, визначені у віці 1,5; 2; 3; 6; 9; 12; 16; 18; 21 і 24 міс.

Найнижчі показники щільності стегнової кістки відзначаються у щурів віком 1,5 міс — у початковому терміні спостереження. При вимірі щільності стегна через два тижні, а саме в 2-місячному віці, відмічається значне збільшення цього показника. Дослідження щільності стегнових кісток 3-місячних щурів показує подальше збільшення щільності, що свідчить про нагромадження мінеральних компонентів у кістковій тканині. Інтенсивний приріст щільності у самців триває до 6-місячного віку, після чого збільшення досліджуваного показника стає незначним. У середньому в самців віком від 6 до 18 міс щільність стегнової кістки найбільш стабільна, з 21-го місяця вона починає знижуватися.

Коефіцієнт ЛФ/КФ кісткової тканини, як і щільність стегнової кістки, істотно, у 1,9 разу, збільшується у віці від 1,5 до 3 міс. У 3-місячному віці цей показник досягає максимальної величини, після чого відзначається поступове його зменшення до 16 міс, а після 16 міс коефіцієнт ЛФ/КФ знижується дуже різко. Так, у період від 16 до 18 міс досліджуване співвідношення зменшується в 2,6 разу. Найнижчі значення цьо-

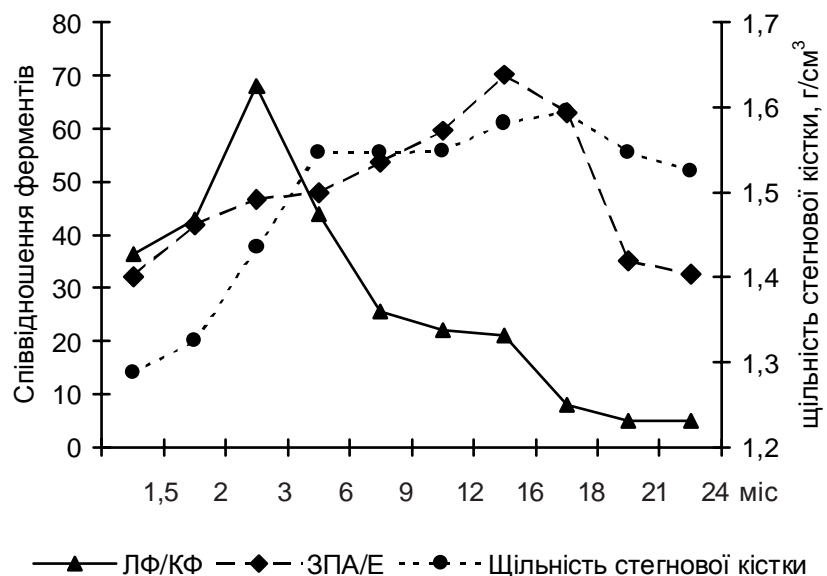


Рисунок. Вікова динаміка зміни щільності стегнових кісток, коефіцієнтів ЗПА/Е і ЛФ/КФ у самців щурів



го показника в гомілкових кістках зареєстровані у віці 21 і 24 міс (див. рисунок).

Якщо коефіцієнт ЛФ/КФ різко збільшується в гомілкових кістках щурів до 3-місячного віку, то співвідношення ЗПА/Е, що показує інтенсивність білкового обміну кісткової тканини, продовжує зростати поступово до 16 міс. Так, у період від 1,5 до 16 міс показник ЗПА/Е збільшується в 2,2 разу, а потім з 16 до 24-го місяця — у стільки ж разів знижується.

Узагальнюючи показники, які наводяться на рисунку, необхідно відзначити, що крива вікової зміни щільності стегнової кістки в більшому ступені збігається з кривою зміни ЗПА/Е і відрізняється від кривої ЛФ/КФ, оскільки це співвідношення починає знижуватися з 6-го місяця, тобто ще задовго до зменшення щільності стегнової кістки. Цей факт потребує пояснення, оскільки було встановлено, що зниження ЛФ/КФ від 6-го до 16-го місяця відбувається внаслідок того, що в цей віковий період активність ЛФ нижча, ніж у віці 1,5–3 міс. Тим же часом вік від 6 до 16 міс характеризується стабільною щільністю стегнової кістки, сталістю активності ЛФ і, отже, стабільною функціональною активністю остеобластів дорослих щурів. Зниження співвідношення ЛФ/КФ після 18-го місяця життя у щурів відбувається за рахунок різкого збільшення в цьому віці активності кислої фосфатази, що свідчить про перевагу процесів резорбції в кістковій тканині.

Таким чином, проведений аналіз отриманих результатів свідчить про те, що співвідношення ЛФ/КФ не завжди об'єктивно відбиває стан кісткової тканини: у віковому періоді від 6 до 16 міс щільність кісткової тканини у щурів досить висока і постійна на фоні зниження показника ЛФ/КФ. На відміну від цього, вікові зміни співвідношення ЗПА/Е кісткової тканини практично цілком збі-

гаються з динамікою зміни щільності стегнової кістки: збільшуються з 1,5 до 3–6 міс, потім приблизно до 18 міс істотно не змінюються, після чого різко знижуються. Проведений аналіз дозволяє припустити, що коефіцієнт ЗПА/Е є більш об'єктивним показником функціонального стану кісткової тканини порівняно з ЛФ/КФ.

У таблиці подаються результати аналізу досліджуваних показників у кістках щурів, яким відтворювали різні типи остеопорозу (ОП). Після моделювання преднізолонового ОП або постменопаузального ОП визначається чітка тенденція до зниження щільності стегнової кістки щурів. При цьому аліментарна модель призводить до чималого зменшення щільності стегнової кістки ($P < 0,001$), що, можливо, може пояснюватися більшою тривалістю, протягом 4 міс, моделювання цієї патології.

Дослідження активності протеаз кісткової тканини показує, що ОП, незалежно від його пускового механізму, призводить до пригнічення ЗПА в кістковій тканині в середньому в 1,6 разу. На фоні такого зниження активності казеїнолітичних ферментів у кістковій тканині щурів спостерігається вірогідне підвищення активності еластази після введення преднізолону ($P < 0,001$) і після утримання щурів на дієті, дефіцитний за низкою незамінних компонентів ($P < 0,05$). При цьому відтворення ОП шляхом двобічної оваріоектомії впливає на активність еластази в кістковій тканині тварин. Таким чином, унаслідок зменшення ЗПА й одночасного збільшення активності еластази в кістковій тканині щурів коефіцієнт ЗПА/Е знижується в 3,1 разу при моделюванні преднізолонового ОП, у 1,9 разу — постменопаузального ОП і в 2,9 разу — аліментарного ОП (див. таблицю).

Характер зміни активності кісткових фосфатаз на фоні

остеопорозу не має певних закономірностей при відтворенні різних моделей патології. Так, активність КФ не змінюється в кістковій тканині при моделюванні преднізолонового і постменопаузального ОП і вірогідно знижується при патології, спричиненій дефіцитом аліментарних факторів ($P < 0,05$). Зменшення активності кісткової ЛФ відзначається тільки у разі відтворення постменопаузального ОП ($P < 0,01$). На фоні преднізолонової й аліментарної моделі ОП активність ЛФ у кістковій тканині тварин, навпаки, вірогідно збільшується ($P < 0,05$). На нашу думку, таке підвищення активності кісткової ЛФ свідчить про інтенсифікацію функціональної активності остеобластів, а зниження активності КФ у кістковій тканині при аліментарному ОП, яке можна трактувати як зменшення активності остеокластів, пояснюється компенсаторною реакцією, спрямованою на збереження функціональної та структурної організації кісткової тканини при впливі патогенних факторів. У результаті різнобічних змін активності фосфатаз у кістковій тканині коефіцієнт ЛФ/КФ збільшується на фоні преднізолонового і аліментарного ОП і знижується при постменопаузальному ОП.

Таким чином, аналіз активності ферментів кісткової тканини при моделюванні ОП показує помилковість загальноприйнятої думки про те, що активність маркерних ферментів кістки ЛФ і КФ може відображати стан кістки, зокрема, її щільність. Коефіцієнт ЛФ/КФ у кістковій тканині змінюється неоднозначно і різнобічно залежно від патогенного фактора, що діє на кісткову систему тварини. При цьому будь-який фактор, що спричинює зниження щільності кістки тварини, призводить до зменшення активності групи протеолітичних ферментів ЗПА і підвищення активності деструктив-



Вплив остеопоротичних факторів на щільність стегнової кістки, активність кісткових протеаз і фосфатаз у щурів

Показник	Модель ОП					
	Преднізолонова		Постменопаузальна		Аліментарна	
	Норма	Патологія	Норма	Патологія	Норма	Патологія
Щільність стегнової кістки, г/см ³	(1,380±1,096)·10 ⁻²	(1,348±1,141)·10 ⁻²	(1,623±1,715)·10 ⁻²	(1,580±3,261)·10 ⁻²	(1,598±1,600)·10 ⁻²	(1,434±2,773)·10 ⁻² P<0,001
ЗПА, нкат/кг	218,6±17,9	143,7±15,1 P<0,01	234,2±37,4	139,5±12,4 P<0,05	221,4±18,5	128,8±16,2 P<0,01
Активність еластази (Е), мккат/кг	3,58±0,29	7,24±0,85 P<0,001	7,96±0,86	8,85±1,06	5,65±0,54	7,53±0,51 P<0,05
ЗПА/Е	61,1	19,8	29,4	15,8	39,2	17,1
Активність лужної фосфатази (ЛФ), мккат/кг	203,7±19,4	297,5±31,4 P<0,05	477,0±23,9	363,40±7,27 P<0,001	101,80±7,38	256,4±34,9 P<0,001
Активність кислої фосфатази (КФ), мккат/кг	37,7±4,2	36,5±3,8	26,0±2,8	25,0±1,4	18,04±1,60	13,4±1,0 P<0,05
ЛФ/КФ	5,4	8,2	18,3	14,5	5,6	19,2

ної еластази в кістковій тканині. Внаслідок цього співвідношення ЗПА/Е зменшується в 1,9–3,1 разу залежно від обраної моделі патології. При цьому таке зниження відбувається одночасно зі зменшенням щільності кістки (див. таблицю).

Підбиваючи підсумок проведеному аналізу результатів кількох досліджень, можна вважати, що співвідношення ЛФ/КФ не завжди об'єктивно відбиває стан кісткової тканини як у здорових щурів в онтогенезі, так і у тварин, яким моделювали ОП за допомогою різних патогенних факторів. Зміни цього коефіцієнта, за нашими даними, не завжди відповідають показникам щільності кістки. На відміну від цього співвідношення ЗПА/Е, за результатами наших спостережень, є більш інформативним показником стану кісткової тканини, оскільки зміни ЗПА/Е цілком збігаються зі змінами щільності кістки як у здорових щурів в онтогенезі, так і у тварин, яким моделювали ОП.

Проведені дослідження дозволяють рекомендувати метод визначення активності еластази й ЗПА в кістковій тканині, а також розрахунок співвідношення ЗПА/Е як об'єктивні критерії оцінки стану кісткової тканини тварин при моделюванні патології або вивченні лікувально-профілактичної ефективності остеотропних препаратів.

Висновки

1. Функціональний стан кісткової тканини в онтогенезі у самців щурів, а також при моделюванні остеопорозу різного походження об'єктивно відбивають зміни активності кісткових протеаз (ЗПА й еластази Е), і більшою мірою — їхнє співвідношення ЗПА/Е.

2. Рівень активності кісткових фосфатаз, а також їхнє співвідношення ЛФ/КФ на фоні преднізолонового й аліментарного остеопорозу не відповідає



дає щільності кісткової тканини у щурів.

3. Для оцінки стану кісткової тканини в експерименті пропонується визначати активність кісткових казеїнолітичних протеаз (ЗПА) й еластази (Е) з подальшим розрахунком коефіцієнта ЗПА/Е.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Остеопороз: эпидемиология, клиника, диагностика, профилактика и лечение: Монография / Акад. мед. наук Украины; Под ред. Н. А. Коржа, В. В. Поворознюка, Н. В. Дедух, И. А. Зупанца.* — Х.: Золотые страницы, 2002. — 648 с.

2. *Беневоленская Л. И.* Проблема остеопороза в современной медицине // *Вестник РАМН.* — 2003. — № 7. — С. 15-18.

3. *Рожинская Л. Я.* Остеопороз: диагностика нарушений метаболизма костной ткани и кальций-фосфорного обмена (лекция) // *Клин.*

лаб. диагностика. — 1998. — № 5. — С. 25-33.

4. *Минченко Б. И., Беневоленский Д. С., Тишенина Р. С.* Биохимические показатели метаболических нарушений в костной ткани. Ч. I. Реабилитация кости // *Там же.* — 1999. — № 1. — С. 8-15.

5. *Минченко Б. И., Беневоленский Д. С., Тишенина Р. С.* Биохимические показатели метаболических нарушений в костной ткани. Ч. II. Образование кости // *Там же.* — 1999. — № 4. — С. 11-17.

6. *Кропотов А. В., Колодняк О. Л., Колдаев В. М.* Влияние экстракта элеутерококка и иприфлавона на развитие глюкокортикоидного остеопороза // *Бюл. эксперим. биологии и медицины.* — 2002. — Т. 133, № 3. — С. 295-297.

7. *Экспериментальный остеопороз / В. Фролькис, В. Поворознюк, О. Евтушенко, Н. Григорьева // Докт.* — 2003. — № 6. — С. 48-52.

8. *Экспериментальные методы исследования стимуляторов остеогенеза: Метод. рекомендации / А. П.*

Левицкий, О. А. Макаренко, О. В. Деньга и др. — К.: ГФЦ МОЗ Украины, 2005. — 50 с.

9. *Ходаков I. В.* Спосіб визначення щільності кісток лабораторних тварин // *Досягнення біології та медицини.* — 2004. — № 2 (4). — С. 38-41.

10. *Барабаш Р. Д., Левицкий А. П.* Казеинолитическая и БАЭЭ-эстеразная активность слюны и слюнных желез у крыс в постнатальном онтогенезе // *Бюл. эксперимент. биол.* — 1973. — № 8. — С. 65-67.

11. *Visser L., Blouf E. R.* The use of p-nitrophenyl-N-testbutyl-oxycarbonyl-L-alanine as substrate for elastase // *Biochem. of biophys. Acta.* — 1972. — Vol. 268, N 1. — P. 275-280.

12. *Левицкий А. П., Марченко А. И., Рыбак Т. Л.* Сравнительная оценка трех методов определения активности фосфатазы слюны // *Лаб. дело.* — 1973. — № 10. — С. 624-625.

13. *Лакин Г. Ф.* Биометрия. — М.: Высш. школа, 1990. — 352 с.

УДК 615.07:615.214.22

К. Г. Лобашова¹, О. В. Жук², К. Ф. Шемонаєва¹,
Г. Г. Відавська¹, Г. Г. Стрельцова¹

ОСОБЛИВОСТІ ФАРМАКОКІНЕТИКИ 14С-РИБОФЛАВІНУ В ОРГАНІЗМІ МИШЕЙ ПРИ ЙОГО ВНУТРІШНЬОСУДИННОМУ ВВЕДЕННІ

¹Одеський державний медичний університет,
²Опольський державний університет, Польща

Успіхи сучасної фармакотерапії пов'язують не тільки зі створенням нових високоактивних лікарських засобів, але і з розробкою нових лікарських форм, оптимізацією способу та режиму введення препаратів. Виразність і тривалість терапевтичного ефекту лікарської сполуки залежать вивчати від фармакокінетики ліків у організмі та способу їх введення [1; 2]. Одним із визначальних параметрів терапевтичної ефективності лі-

карського засобу є спосіб введення препарату [3–5].

Відповіді на багато питань можна одержати після вивчення фармакокінетики лікарського препарату — процесів проникнення лікарських засобів крізь клітинні оболонки, їх розподілу в організмі, зв'язування з білками плазми й тканин, які можуть виконувати роль депо, а також елімінації з організму [6; 7]. Сьогодні з метою одержання кількісної оцінки всі ці процеси можуть бути

проаналізовані на основі математичних розрахунків [8; 9].

Нині немає чітких уявлень про механізми селективного транспорту ксенобіотиків крізь гематофтальмічний бар'єр [10], тому дослідження процесів фармакокінетики ліків у структурах ока при різних способах їх введення є основою для розробки раціональних підходів в офтальмотерапії, коли необхідне створення стаціонарного рівня концентрації препарату для пролонговано-

