

Л. Д. Попова, М. Г. Щербань, І. М. Васильєва

## АКТИВНІСТЬ ФЕРМЕНТІВ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ В КРОВІ ЩУРІВ ПРИ ГОСТРОМУ ЛОКАЛЬНОМУ ЗАПАЛЕННІ

Харківський національний медичний університет

### Вступ

Відомо, що запальні процеси супроводжуються посиленим продукуванням активних форм кисню (АФК). Поглинання бактерій нейтрофілами та іншими фагоцитарними клітинами супроводжується швидким зростанням використання кисню (відомим як «респіраторний вибух»). Це явище відбувається внаслідок швидкого використання кисню для продукування великої кількості його активних форм за участі НАДФН-оксидази [1]. Супероксидний аніон, що утворюється під дією НАДФН-оксидази, перетворюється супероксиддисмутазою (СОД) на пероксид водню. Пероксид водню використовується мієлопероксидазою для утворення гіпохлоритного аніона, який є потужним оксидантом і має велику бактерицидну дію. Генерується НАДФН пентозофосфатним шляхом окиснення глюкози, який стимулюється аскорбіновою кислотою [1]. Інтенсивність поглинання нейтрофілами вітаміну С супроводжується утворенням бактерицидних вільнорадикальних субстанцій, які знищують бактеріальні, вірусні та інші чужорідні агенти [3].

Для запобігання ушкодженню клітинного гомеостазу в аеробних організмах еволюційно утворилась антиоксидантна захисна система, яка містить мембранозв'язані та цитозольні ферменти — каталазу, СОД, глутатіонпероксидазу (ГП) — і цілу низку низькомо-

лекулярних антиоксидантів [4].

Виникає питання, чи залучаються при локальному запаленні до елімінації АФК ферменти антиоксидантного захисту крові, чи процес знешкодження АФК обмежений місцем запалення. У зв'язку з цим, **метою** роботи було вивчення активності ферментів антиоксидантного захисту, вмісту аскорбату та ТБК-позитивних продуктів у крові щурів при розвитку флегмони м'язів.

### Матеріали та методи дослідження

В експерименті було використано 12 статевозрілих щурів лінії Вістар масою 200–250 г, яких утримували у стандартних умовах віварію. Тварин було розподілено на 2 групи: контрольна (інтактна) та дослідна. У тварин дослідної групи викликали запалення внутрішньом'язовим введенням ліпополісахариду (ЛПС) у дозі 2 мг/100 г [5]. Через 1 добу після введення ЛПС (фаза, що відповідає максимальній лейкоцитарній реакції) тварин декапітували гільйотинним ножем під слабким ефірним наркозом.

Активність каталази в крові визначали спектрофотометричним методом [6] за швидкістю розщеплення пероксиду водню в інкубаційному середовищі. Визначення пероксиду водню проводили за допомогою кольорової реакції з молібдатом амонію.

Активність ГП у крові визначали за методом [7], що базується на реакції окиснення від-

новленого глутатіону (G-SH) кумолом. Активність ферменту визначали за швидкістю перетворення G-SH за допомогою кольорової реакції на -SH-групи з реактивом Елмана при  $\lambda = 412$  нм.

Активність СОД крові визначали спектрофотометричним методом [8] за ступенем гальмування відновлення нітросинього тетразолію.

Вміст аскорбінової кислоти в плазмі крові досліджували титриметричним методом [9], заснованим на здатності АК кількісно відновлювати забарвлений окиснений 2,6-дихлорфеноліндофенол до безбарвної лейкоформи.

Вміст ТБК-позитивних продуктів визначали за методом [10].

Статистичний аналіз отриманих результатів було проведено за допомогою пакета прикладних програм Statistica, MS Excel з використанням U-критерію Манна — Уїтні.

### Результати дослідження та їх обговорення

У тварин дослідної групи було виявлено зростання активностей каталази, ГП і СОД у крові порівняно з контролем (табл. 1).

Супероксиддисмутаза є першою лінією антирадикального захисту в організмі. Вона каталізує реакцію дисмутації супероксидного аніона з утворенням пероксиду водню [10]. У нейтрофілах  $H_2O_2$  є попередником інших АФК. Зростання активності СОД крові може бути наслідком деструкційного процесу у місці запалення і



**Активність ферментів антиоксидантного захисту  
в крові щурів при запаленні, n=6**

Фермент, групи хворих	Медіана, Ме	Квартилі, 25 %; 75 %
Каталаза, мкат/г Hb Контрольна Дослідна	4,18 6,23*	3,85; 4,51 5,43; 6,55
Глутатіонпероксидаза, мкат/г Hb Контрольна Дослідна	37,97 49,17*	35,33; 39,18 47,24; 50,22
Супероксиддисмутаза, мкг/хв на 1 мг білка Контрольна Дослідна	24,2 33,7*	22,4; 27,5 32,1; 36,2

Примітка. У табл. 1 і 2: \* — різниця вірогідна порівняно з контролем.

підвищеного виходу ферментів до крові.

Підвищене утворення пероксиду водню за умов активації вільнорадикальних процесів відбувається в реакціях ферментативної (за допомогою СОД) та спонтанної дисмутації супероксидного аніона, а також у процесі неферментативного окиснення ліпідів [1; 11].

Першочергову роль у розщепленні  $H_2O_2$  відіграють ферменти каталаза та ГП, які утворюють другу лінію ферментативного антиоксидантного захисту. Глутатіонпероксидаза також здатна знешкоджувати ліпопероксидази і, певно, відіграє основну роль у процесах їх інактивації [12]. Зростання активностей каталази та ГП свідчить про підвищене надходження до крові  $H_2O_2$  і ліпопероксидів, що непрямо підтверджується зростанням рівня

ТБК-позитивних продуктів у крові (табл. 2).

Вміст АК у крові тварин дослідної групи не відрізнявся від контрольної (див. табл. 2), проте ця інформація є недостатньою для висновків стосовно її використання та забезпеченості нею організму.

Таким чином, знешкодження активних форм кисню, що утворюються при локальному запаленні, відбувається не тільки в місці запалення, але й за участі антиоксидантних ферментів крові. Визначення вмісту аскорбінової кислоти лише в крові не може бути використано як показник забезпеченості нею та її використання організмом.

У зв'язку з цим ми плануємо дослідження ферментів антиоксидантного захисту та вмісту аскорбату в здоровій та ушкодженій ділянці м'яза з флегмоною.

Таблиця 2

**Вміст ТБК-позитивних продуктів і аскорбінової кислоти  
у крові щурів при запаленні, мкмоль/л, n=6**

Досліджуваний параметр, групи хворих	Медіана, Ме	Квартилі, 25 %; 75 %
ТБК-позитивні продукти Контрольна Дослідна	1,98 3,84*	1,85; 2,11 3,59; 4,11
Аскорбінова кислота Контрольна Дослідна	6,98 5,47	6,08; 7,65 5,08; 6,42

1. *Harper's Biochemistry* / R. K. Murray, D. K. Granner, P. A. Mayes, V. W. Rodwell. — New Jersey : Prentice Hall, 1996. — 868 p.

2. Moser R. Uptake of ascorbic acid by human granulocytes / R. Moser, F. Weder // *Int. Archs Allergy Appl. Immun.* — 1986. — Vol. 81 — P. 46–48.

3. *Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells. Action as a pro-drug to deliver peroxide to tissues* / Q. Chen, M. G. Espey, M. C. Krishna [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2005. — Vol. 102, N 38. — P. 13604–13609.

4. Саприн А. Н. Окислительный стресс и его роль в механизмах апоптоза и развитии патологических процессов / А. Н. Саприн, Е. В. Калинина // *Успехи биологической химии.* — 1999. — Т. 39. — С. 289–326.

5. *Морфофункциональная характеристика реакции иммунной системы крыс Вистар после воздействия сублетальной дозы липополисахарида* / А. И. Яблонская, О. В. Макарова, Л. И. Михайлова [и др.] // *Иммунология.* — 2009. — № 13. — С. 145–147.

6. Дубинина Е. Е. Методы определения активности каталазы / Е. Е. Дубинина, Л. Ф. Ефимова, Л. Н. Сафронова // *Лабораторное дело.* — 1988. — № 8. — С. 16–19.

7. Mein V. M. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах / В. М. Mein // *Лабораторное дело.* — 1986. — № 2. — С. 724–727.

8. Гуревич В. С. Сравнительный анализ двух методов определения активности СОД / В. С. Гуревич, К. Н. Конторщиков, Л. В. Шатилина // *Лабораторное дело.* — 1990. — № 4. — С. 44–47.

9. *Метод определения аскорбиновой кислоты* : рук. по методам анализа качества и безопасности пищевых продуктов / под ред. И. М. Скурихина, В. А. Тутельяна. — М. : Медицина, 1998. — С. 168–182.

10. Федотова Т. К. Реакция с ТБК для определения МДА крови методом флюориметрии / Т. К. Федотова, Т. С. Коршунова, Э. Т. Ларская // *Лабораторное дело.* — 1983. — № 3. — С. 25–28.

11. Голиков С. Н. Общие механизмы токсического действия / С. Н. Голиков, И. В. Саноцкий, Л. А. Гиунов. — Л. : Медицина, 1986. — 276 с.

12. Абрамова Ж. И. Человек и противовоспалительные вещества / Ж. И. Абрамова, Г. И. Оксенсендлер. — Л. : Наука, 1985. — 230 с.

