



О.В. Волобуєва

## ЗМІНИ СПОНТАННОЇ ТА H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ІНДУКОВАНОЇ БІОХЕМІЛЮМІНЕСЦЕНЦІЇ ГОМОГЕНАТІВ ВЕЛИКОЇ ПРИВУШНОЇ ЗАЛОЗИ ПРИ ГОСТРОМУ СІАЛАДЕНІТІ

Національний фармацевтичний університет, м. Харків

**Ключові слова:** гострий сіаладеніт, біохемілюмінесценція, перекисне окислення ліпідів, α-токоферолу ацетат, мексидол.

**Ключевые слова:** острый сиалоаденит, биохемилуминесценция, перекисное окисление липидов, α-токоферол ацетат, мексидол.

**Key words:** acute sialoadenitis, biochemiluminescence, lipid peroxidation, α-tocopherol acetate, meksidol.

Вивчено спонтанну й H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-індуковану біохемілюмінесценцію гомогенатів великої привушної залози при гострому сіаладеніті. Встановлено, що мексидол та α-токоферолу ацетат не впливають на спонтанну хемілюмінесценцію гомогенатів великої привушної залози й інгібують H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-індуковану хемілюмінесценцію при гострому сіаладеніті.

Изучены спонтанная и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-индуцированная биохемилуминесценция гомогенатов большой околоушной железы при остром сиалоадените. Установлено, что мексидол и α-токоферол ацетат не влияют на спонтанную хемилуминесценцию гомогенатов большой околоушной железы и ингибируют H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-индуцированную хемилуминесценцию при остром сиалоадените.

We studied the spontaneous and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced biochemiluminescence homogenates of large parotid gland in acute sialoadenitis. It was revealed that meksidol and α-tocopherol acetate did not affect the spontaneous chemiluminescence of homogenates of large parotid gland and inhibit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced chemiluminescence in acute sialoadenitis.

Зміни активності ПОЛ виявляються практично при всіх реакціях організму на різноманітні екстремальні впливи та стани: гіподинамію, гіпоксію, гіпер- і гіпотермію, вплив іонізуючої радіації, запальні захворювання тощо. Вивчення процесів ПОЛ дозволяє судити про ступінь тяжкості патологічного процесу, а також ефективність проведеного лікування [4,5].

Одним з найбільших інформативних методів оцінки ПОЛ є метод біохемілюмінесценції, тобто випромінювання живих організмів, тканин, клітин, гомогенатів у видимій інфрачервоній ділянці хвилі (360–800 нм).

### МЕТА РОБОТИ

Дослідження впливу мексидолу і α-токоферолу ацетату на спонтанну й H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-індуковану біохемілюмінесценцію гомогенатів великої привушної залози при гострому сіаладеніті.

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Для оцінки ЗАА хемілюмінометрично використовували ХЛ-реакцію рибофлавіну з перекисом водню за наявності іонів двоцвалентного заліза [2]. Реакційна суміш містила 610 мкл 75 мМ фосфатного буферу (рН 9,0), 40 мкл 10 мМ розчину рибофлавіну, 50 мкл 25 мМ розчину FeSO<sub>4</sub>, 200 мкл 20 мМ розчину H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> та 100 мкл бідистильованої води. У проби замість бідистильованої води вносили 100 мкл екстракту гомогенізованої великої привушної залози.

Вимірювання світлосуми здійснювали протягом 2–3 хвилин за температури 37°C. ЗАА виражали в умовних одиницях на 1 мг білка, розраховуючи її за формулою:

$$\text{ЗАА} = (1 - \text{CC}_{\text{он}} / \text{CC}_{\text{к}}) / \text{А},$$

де  $\text{CC}_{\text{он}}$  – величина світлосуми дослідного зразка;  $\text{CC}_{\text{к}}$  – величина світлосуми контрольної проби; А – вміст білка в реакційній суміші [1].

Для збільшення інформативності після реєстрації спонтанного світіння в кювету з гомогенатами додавали перекис водню, що посилює біохемілюмінесценцію [1].

Досліди проведено на 40 нелінійних білих щурах вагою 180–200 г. Тварин розподілили на 4 групи по 10 щурів у кожній: перша група – інтактна, друга – неліковані щури з гострим сіаладенітом (контроль), третя – експериментальна група – хворі тварини, яким вводили мексидол, четверта – експериментальна група – хворі тварини, яким вводили α-токоферолу ацетат. Гострий сіаладеніт викликали за методом, описаним [3,8] та вдосконаленим нами. Дослідження проведено через 1, 6 та 24 години в групах без лікування та на фоні введення мексидолу й α-токоферолу ацетату. Останні вводили внутрішньошлунково за 60 хвилин до початку експерименту в дозах  $\text{ED}_{50} = 100$  мг/кг [6].

Усі больові маніпуляції виконували під етамінал-натрієвим наркозом (40 мг/кг внутрішньоочеревинно). Експерименти проведено на базі Інституту проблем кріобіології та кріомедицини АМН НАН України (м. Харків) під керівництвом д. біол. н. А.М. Петренко.

Обробку результатів спонтанної біохемілюмінесценції гомогенатів великої привушної залози у щурів при введенні мексидолу й α-токоферолу ацетату проведено відносно групи щурів з гострим сіаладенітом без лікування. Показники перших 60 хвилин досліду порівнювали з даними інтактних тварин.

Результати експериментів оброблювали статистично з використанням t-критерію Стьюдента [7].

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що параметри біохемілюмінесценції (амплітуда та світлосума) не змінювались при розвитку гострого сіаладеніту у перші 60 хв, збільшувались на 10 та



15% відповідно після введення мексидолу й  $\alpha$ -токоферолу ацетату (табл. 1). Через 6 годин, а особливо через 24 години, амплітуда та світлосума біохемілюмінесценції у контрольних щурів (без введення препаратів) різко зростала (на 80 і 90% відповідно).

Таблиця 1

**Параметри спонтанної біохемілюмінесценції гомогенатів великої привушної залози щурів з гострим сіаладенітом при введенні мексидолу та  $\alpha$ -токоферолу ацетату ( $M \pm m$ )**

Групи тварин	Час після введення флогогену	Параметри біохемілюмінесценції	
		Амплітуда, імп/г тканини	Світлосума, імп/3 хв/г тканини
Інтактні щури	-	34 $\pm$ 2	130 $\pm$ 18
Щури з гострим сіаладенітом, контроль	60 хв	35 $\pm$ 2	134 $\pm$ 16
	6 год	55 $\pm$ 2	228 $\pm$ 16*
	24 год	64 $\pm$ 4	255 $\pm$ 20*
Щури з гострим сіаладенітом+мексидол	60 хв	31 $\pm$ 4	114 $\pm$ 18*
	6 год	28 $\pm$ 2	80 $\pm$ 16*
	24 год	9 $\pm$ 4	25 $\pm$ 14
Щури з гострим сіаладенітом + $\alpha$ -токоферолу ацетат	60 хв	30 $\pm$ 6	112 $\pm$ 16*
	6 год	26 $\pm$ 2	78 $\pm$ 16
	24 год	7 $\pm$ 4	23 $\pm$ 14

Примітки: n=10; статистичну обробку результатів проведено відносно групи щурів з гострим сіаладенітом без введення препаратів; показники перших 60 хв досліді порівнювали з даними, отриманими у інтактних тварин; \* – різниця вірогідна ( $p < 0,05$ ).

У тварин з гострим сіаладенітом, яким за 60 хвилин до початку експерименту вводили мексидол й  $\alpha$ -токоферолу ацетат, параметри біохемілюмінесценції значно зменшувалися на 50 і 65%, а через 24 години – на 85 і 90% відповідно.

При додаванні у кювети перекису водню амплітуда  $H_2O_2$ -індукованої біохемілюмінесценції гомогенатів великої привушної залози при розвитку гострого запалення без введення препаратів і при введенні мексидолу й  $\alpha$ -токоферолу ацетату відрізнялись від контролю ( $p < 0,05$ ).

Водночас світлосума біохемілюмінесценції, визначена через 6 годин після розвитку запалення у великій привушній залозі, збільшувалась більш ніж у двічі, порівняно з контрольною групою, а через 24 години підвищувалась ще на 42% (табл. 2).

У щурів, яким введено мексидол або  $\alpha$ -токоферолу ацетат, світлосума знизилась через 6 годин досліді на 32%, а через 24 години досягла рівня контролю. При цьому світлосума була у тричі нижчою за рівень біохемілюмінесценції у тварин, які не отримували препаратів (табл. 2).

Введення перекису водню дало можливість оцінити рівень спонтанного перекисного окислення ліпідів (СПОЛ) при тому, що спонтанна біохемілюмінесценція виражала інтенсивність спонтанного окислення ліпідів, а амплітуда спалаху, індукованого  $H_2O_2$ , характеризувала стійкість гомогенатів великої привушної залози до перекисного окислення. Її величина, згідно з даними спеціалізованої літератури, прямо пропорційна окисленню ліпідів і концентрації металів перемінної валентності й

зворотно пропорційна вмісту антиоксиданту у матеріалі, що вивчається [1]. Аналіз отриманих даних показав, що мексидол й  $\alpha$ -токоферолу ацетат проявляють виражені антиоксидантні властивості при гострому сіаладеніті.

Для з'ясування причин відмінностей у світлосумі біохемілюмінесценції гомогенатів великої привушної залози при розвитку запалення без введення препаратів і при введенні мексидолу й  $\alpha$ -токоферолу ацетату, виявлених у результаті експерименту, проведено дослідження динаміки хемілюмінесценції. Встановлено, що інтенсивність світіння гомогенатів великої привушної залози контрольних тварин швидко знижувалась протягом першої години, а потім повільно виходила на стаціонарний рівень. Водночас, через 6 годин досліді (різко виражене запалення) введення  $H_2O_2$  викликало спалах за амплітудою, що практично дорівнював такій у контрольних тварин.

Однак, високий рівень біохемілюмінесценції зберігався протягом 6 годин, і тільки потім починав знижуватись. При цьому швидкість зниження біохемілюмінесценції не відрізнялась від такої у тварин інших груп. Дослідження, проведені на фоні дії мексидолу й  $\alpha$ -токоферолу ацетату, показали зменшення латентного періоду і зростання швидкості зниження світіння у порівнянні зі щурами, які не отримували препаратів, на 6 годині експерименту і практично повну відсутність динаміки біохемілюмінесценції через 24 години після початку досліді у порівнянні з контролем.

Відомо, що у тканинах (у даному випадку гомогенат великої привушної залози) є захисні системи, здатні контролювати інтенсивність перекисного окислення. До них належать, насамперед, спеціалізовані ферменти: супероксиддисмутаза, супероксидний іон з дисмутазною активністю, глутатіонпероксидаза, що інактивує перекиси, каталаза, що розкладає перекис водню. Дослідження спонтанної хемілюмінесценції (табл. 2) показали, що захисні системи тканин великої привушної залози контролюють перекисні процеси, що розвиваються при запаленні.

Таблиця 2

**$H_2O_2$ -індукована біохемілюмінесценція гомогенатів великої привушної залози щурів з гострим сіаладенітом, яким вводили мексидол та  $\alpha$ -токоферолу ацетат ( $M \pm m$ )**

Групи тварин	Час після введення флогогену	Параметри біохемілюмінесценції	
		Амплітуда, імп/г тканини	Світлосума, імп/3 хв/г тканини
Інтактні щури	-	23904 $\pm$ 936	41290 $\pm$ 4248
Щури з гострим сіаладенітом, контроль	6 год	24200 $\pm$ 1344	83772 $\pm$ 8088*
	24 год	24440 $\pm$ 2172	117208 $\pm$ 2498*
Щури з гострим сіаладенітом + мексидол	6 год	22258 $\pm$ 1452	63216 $\pm$ 7741*
	24 год	23724 $\pm$ 1568	41674 $\pm$ 2836
Щури з гострим сіаладенітом + $\alpha$ -токоферолу ацетат	6 год	23722 $\pm$ 1555	41664 $\pm$ 2830
	24 год	23720 $\pm$ 1560	41669 $\pm$ 2827*

Примітки: n=10; \* – різниця відносно контролю вірогідна ( $p < 0,05$ ).



За наявності перекису водню різко зростає концентрація продуктів вільнорадикального окиснення. І, як показали експерименти, інтактні тварини здатні з високою швидкістю знижувати їх вміст до безпечного для організму рівня. Однак при розвитку запалення ендогенні системи не можуть метаболізувати перекисні з'єднання, що зберігаються протягом тривалого часу [4,5].

З іншого боку, швидкість зниження індукованого світіння відображала активність антиоксидантних систем за зневодненням токсичних продуктів ПОЛ. У зв'язку з цим можна припустити, що при розвитку запалення у великій привушній залозі знижується активність ендогенних захисних систем або вони функціонують з активністю, близькою до максимальної, що дозволяє зберегти на безпечному рівні інтенсивне утворення токсичних продуктів ПОЛ за відсутності індукторів. Різке зменшення часу інтенсивного світіння і збільшення швидкості зниження хемілюмінесценції вже через 60 хв після початку експерименту і через 6 годин після введення мексидолу та  $\alpha$ -токоферолу ацетату можна пояснити тим, що препарати є похідними бурштинової кислоти, яка є природним метаболітом організму, що поєднує всі метаболічні шляхи циклу Кребса [4]. Останнє дає можливість мексидолу та  $\alpha$ -токоферолу ацетату інгібувати утворення високих концентрацій ПОЛ і швидко їх метаболізувати.

#### ВИСНОВКИ

Показники амплітуди та світлосуми спонтанної хемілюмінесценції не змінюються при короткочасному (60 хв) запаленні великої привушної залози.

Тривалий запальний процес (24 години після введення карагеніну) супроводжується збільшенням часу

інтенсивного світіння після індукції перекисом водню.

Мексидол та  $\alpha$ -токоферолу ацетат не впливають на спонтанну хемілюмінесценцію гомогенатів великої привушної залози й інгібують  $H_2O_2$ -індуковану їх хемілюмінесценцію при гострому сialаденіті.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Арутюнян А.В. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма: Метод. реком. / Арутюнян А.В., Дубина Е.Е., Зыбина Н.Н. – СПб.: ИКФ «Фолиант», 2000. – 104 с.
2. Богуславский А.Ю. Вплив порушення синтезу NO на скорочувальну активність та кисневу вартість роботи скелетного м'яза собаки / Богуславский А.Ю., Сагач В.Ф. // Клінічна та експериментальна патологія. – 2004. – Т. III, №2. – С. 82–83.
3. Бондаренко В.В. Зміни енергетичного метаболізму, вільнорадикального окислення ліпідів в слинних залозах при утворенні надлишкової кількості оксиду азоту з екзогенних та ендогенних попередників: автореф. дис. ... канд. мед. наук / Бондаренко В.В. – К., 2001. – 16 с.
4. Губский Ю.И. Антиокислительная и антирадикальная активность антиоксидантов разных классов / Ю.И. Губский, Н.В. Литвинова, Э.В. Шнурко-Табакова // Клінічна фармація. – 2007. – №4. – С. 114–117.
5. Зентов Н.К. Окислительный стресс. Биохимические и патофизиологические аспекты / Н.К. Зентов, В.З. Ланкин, Е.Б. Меньщикова. – М.: Наука, 2001. – 340 с.
6. Красовський Г.Н. Применение метода биохемілюмінесценции в санитарно-токсикологических исследованиях / Красовський Г.Н., Жуков В.И., Бондаренко Л.А. // Гигиена и санитария. – 1989. – №11. – С. 35–39.
7. Сернов Л.Н. Элементы экспериментальной фармакологии / Л.Н. Сернов, В.В. Гацура. – М., 2000. – 133 с.
8. Щипский А.В. О патогенезе сialаденоза и сialаденита по данным экспериментальных исследований / Щипский А.В., Афанасьев В.В., Денисов А.Б. // Пародонтология. – 2005. – №3 (36). – С. 78–84.

#### Відомості про автора:

Волобуєва О.В., здобувач каф. патологічної фізіології НФаУ.

#### Адреса для листування:

Волобуєва Олена Валеріївна. 61210, м. Харків, вул. Мельникова, 12, каф. патологічної фізіології НФаУ.

Тел.: (057) 706 30 66.