

Summary

COMPARATIVE ANALYSIS OF FIBRO-ARCHITECTURE AND TISSUE TENSION IN MEMBRANOUS GRAFTS OF DIFFERENT TAUTNESS DURING ORAL FLAP SURGERIES

Kaplun D.V., Skrypnik V.M., Stavtyskiy S.O.

Key words: scrap surgery, fibroarchitecture.

Taking into account the development of modern oral surgery, the issue on improving the closure of the wounds of the oral mucous membrane remains relevant. Hence, it is important to study the morphological properties of the oral mucosa flaps for detecting optimal tensile and tissue stress values in the site of suturing. The aim of this study was to carry out a comparative analysis of the fibroarchitecture of oral mucosa under varying degrees of tension during oral flap operations. Materials and methods. To perform histological investigations, samples of healthy mucous membrane of gums were taken from mature cadavers of both sexes at the forensic medical examination office. The material was taken from both the area of gum papilla and from its fixed part. Polarization microscopy was used to study the fibroarchitecture of connective tissue structures. Results. At different degrees of tension of the mucosal flaps in the oral cavity, the connecting flap loses the normal spatial orientation of the bundles, and the entire fibrous framework becomes deeply disorganized. Conclusions. The propria plate of the gingival mucosa includes the dentogingival circular and alveolar-gingival bundles of collagen and elastic fibres forming a single soft core. In the structure of the gingival connective tissue there are marked fibrous bundles adapted to compressive deformation: fiber-fibrillar and arcade types of fibroarchitecture having a high modulus of elasticity.

УДК 616.12-008.331.1:616-092.41-085.615.225.2.615.036.6

Нагорна О.О.

ВПЛИВ ПОХІДНИХ 1,2,4-ТРИАЗОЛУ НА СПОЛУЧЕНІ СИСТЕМИ: ВІДНОВЛЕНІ ТІОЛИ/NO IN VITRO

Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця

Проводили дослідження антиоксидантних властивостей та впливу на тіол-дисульфідну систему суспензії нейронів в досліді in vitro за умов моделювання оксидативного та нітрозуючого стресу шляхом додавання до інкубаційного середовища динітрозильного комплексу заліза в токсичній концентрації 250 ммоль/л за Методичними рекомендаціями ДЕЦ МОЗ України. При нітрозуючому оксидативному стресі в нейрональній суспензії встановили зростання вмісту показників окислювальної модифікації білків (АФГ, КФГ), окислювального глутатіону, нітротирозину та пониження антиоксидантної активності, активності глутатіонредуктази, глутатіон-S-трансферази та рівня відновленого глутатіону. Додавання в суспензію нейронів 11 тіолвміщуючих сполук показало, що всі використані сполуки, за винятком двох, за антиоксидантною активністю перевищували референт-препарати – метіонін, унітіол, тіосульфат натрію, дибунол, альфа-токоферол. Тіолвміщуючі сполуки понижували вміст нітротирозину, стабільного ендogenousного продукту окиснення пероксинітриту, що використовується в якості маркера пошкодження. Тіолвміщуючі сполуки понижували вміст окисненого глутатіону та підвищували відновленого, який розглядається як інгібітор активних форм кисню. Тіолвмісні сполуки, особливо тіотриазолін та ангіолін, зберігали активність глутатіон-S-трансферази та глутатіонредуктази, що стверджує їх антиоксидантну дію.

Ключові слова: тіолвмісні сполуки, нітрозуючий, оксидативний стрес, маркери окислювального пошкодження білків, тіол-дисульфідна система та система оксиду азоту.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дана робота є фрагментом наукової роботи кафедри фармакології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця: «Експериментальне дослідження фармакологічних властивостей ендотеліопротекторних сполук» (№ держреєстрації 0115U004159), а також фрагментом науково-дослідної роботи кафедри фармакології та медичної рецептури Запорізького державного медичного університету за темою «Молекулярно-біохімічні механізми формування мітохондріальної дисфункції нейронів головного мозку за умов гострої церебральної ішемії: нові мішені для нейропротекції» (№ держ.реєстрації 0113U000797)

Вступ

В Запорізькому державному медичному університеті проводився цілеспрямований пошук біологічно активних сполук серед п'яти- та шестичленних азагетероциклічних сполук і їх конденсованих аналогів. Внаслідок цих досліджень серед похідних триазолу був виявлений лікарський засіб, який отримав назву «тіотриазолін». Тіотриазолін – високоактивний препарат з широким спектром дії, що має кардіо-, нейро- та гепатопротекторну дію [6]. Встановлено, що пору-

шення метаболізму і функції життєво важливих органів пов'язані з дисфункцією ендотелію, яка, в свою чергу, обумовлена зміщеннями тіол-дисульфідної системи та системи оксиду азоту [4], що є підставою для застосування тіолових сполук для попередження змін метаболізму і функції ендотелію[1]. Тому пошук нових ендотеліопротекторів доцільно проводити серед похідних триазолу з урахуванням їх впливу на маркери окислювального пошкодження білків та тіол-дисульфідної системи [2].

Мета дослідження

Провести скринінг похідних 1,2,4-триазолу за наявністю дії та впливу на тіол-дисульфідну систему нейронів при оксидативному і нітрозуючому стресі *in vitro*.

Матеріали і методи дослідження

Для досліджень *in vitro* використовували 95 безпородних білих щурів-самців у віці 4 тижнів і масою 80 - 100 г., що утримувалися у віварії НМУ ім. О.О. Богомольця відповідно до положень Європейської конвенції про захист безхребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей (Страсбург, 2005), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених П'ятим національним конгресом з біоетики, Київ, 2013.

Виділення збагачених фракцій нейронів і нейроглії проводилось у два етапи. На першому етапі мозкова тканина дезінтегрується з метою одержання клітинної суспензії, на другому – здійснюється диференціальне ультрацентрифугування у градієнті щільності сахарози і фіколу. Для одержання нейронів і нейроглії щурів декапітують і швидко вилучають мозок. Кору головного мозку відокремлюють від білої речовини, подрібнюють і переносять у розчин, що містить 7,5% полівінілпіролідону (ПВП), 1% бичачий сироватковий альбумін (БСА) і 10 мМСаCl₂. Отриману суспензію фільтрують через три сита під невеликим тиском для зменшення втрат нейрональних клітин. Після послідовного пропускання через сита клітинну суспензію нашаровують на градієнт, що складається з 2 видів сахарози — 1М і 1,75М. Центрифугування проводять при 60000g протягом 15 хв (при температурі 10°C). У результаті центрифугування одержують два шари і щільний осад. Верхній шар представлений залишками мієлінових оболонок, другий шар складається з гліальних і нейрональних клітин. Осад, представлений тілами нейронів, відповідає ступеню чистоти 90%. Надалі проводять додаткове очищення другого шару шляхом другого фільтрування й ультрацентрифугування. Виділені нейрональні клітини відмивають від сахарози й альбуміну охолодженим фізіологічним розчином (температура розчину 4 °C). Отриману в такий спосіб суспензію ділять на серії:

– інтактна: суспензія нейронів без внесення ініціюючих агентів і досліджуваних потенційних нейропротекторів;

– контрольна: суспензія нейронів, до якої додають агенти, що ініціюють оксидативний і нітрозуючий стреси;

— з метою моделювання нітрозуючого стресу, в інкубаційне середовище у токсичній концентрації (0,1-5 мкМ) вносять динітрозольний комплекс заліза (DNIC). DNIC, на відміну від NO, виступає більш сильним нітрозилуючим агентом, взаємодіє з тіолами білків, гістидином, аспартамом, глутаміном, метіоніном, цистеїном, глутатином і утворює N- та S-нітрозотіоли в токсичній

зоні 250 мкмоль.

За умов нормального функціонування клітин, фізіологічних концентрацій оксиду азоту та відсутності дефіциту кисню утворення DNIC є необхідною умовою для транспорту активних форм азоту. Токсичний вплив цієї сполуки на метаболізм клітин проявляється лише при розвитку оксидативного стресу. Значні концентрації DNIC викликають оборотне, а на більш пізніх етапах, незворотне окиснення та нітрозилування значної частини регуляторних та транспортних білків цитоплазми, внутрішньої та зовнішньої клітинної мембрани. За таких умов відбувається окиснення металів змінної валентності – міді, цинку, заліза, які знаходяться в активних центрах білків-ферментів, що призводить до їх інактивації. Особливо важливими вказані перетворення є для ферментів, що задіяні у підтримці антиоксидантного захисту.

Для оцінки інтенсивності оксидативного стресу в цитозольній фракції гомогенату головного мозку визначали маркери окисної модифікації білка – альдегідфенілгідрозони (АФГ) і кетонфенілгідрозони (КФГ).

Біохімічний метод оцінки заснований на реакції взаємодії окислених амінокислотних залишків з 2,4-динітрофенілгідрозиною (2,4-ДНФГ) з утворенням 2,4-динітрофенілгідрозонів. Для цього до 0,2 мг цитозольної та мітохондріальної фракцій клітин додавали 0,1 мл 25% трихлороцтової кислоти та центрифугували 30 хв при 3000 об/хв. Далі до осаду додавали 1 мл 2,2% ДНФГ та інкубують 1 год при температурі 37°C, потім повторно центрифугували 10 хв при 3000 об/хв. Осад, що утворився, промивають 3 мл етилацетату, розчиняють у 3 мл 50% розчину сечовини, додають 1 краплю 7% розчину соляної кислоти та розводять дистильованою водою в 12 разів. Підготований таким чином розчин надалі досліджували на спектрофотометрі, визначаючи вміст АФГ при довжині хвилі 274 нм, КФГ – при 363 нм [7].

Глутатіон відновлений встановлювали за методом, заснованим на взаємодії ортофталієвого ангідриду з відновленим глутатіоном, унаслідок чого утворюється флюоресціюючий комплекс, який реєструється флюорометрично при $E_{x}/E_{m}=340/420$ нм. Глутатіон розраховували за калібрувальною кривою [7]. Глутатіонредуктаза (ГР) відновлює дисульфідний зв'язок окисненого глутатіону GSSG до його сульфгідрильної форми GSH. Відновлення глутатіону відбувається за рахунок енергії НАДФ-Н, що утворюється в пентозному циклі ГР. Є одним з основних ферментів тіол-дисульфідної системи.

Глутатіон-S-трансфераза (Г-S-T) входить до родини ферментів, що нейтралізують токсичний вплив різних гідрофобних і електрофільних сполук шляхом їх кон'югації з відновленим глутатіоном. Г-S-T локалізована переважно у цитозолі клітин. Основна функція GST — захист клітини від цитотоксичних продуктів окисної модифікації

білкових молекул, ліпідів шляхом їх відновлення, приєднання до субстрату молекули глутатіону або нуклеофільного заміщення гідрофобних груп. Є одним із ключових ферментів як антиоксидантної, так і тіол-дисульфідної систем. Зміна активності даного ензиму відображає спрямованість, перебіг патологічного процесу, а також ефективність лікування. Принцип методу: активність глутатіон-S-трансферази визначають за швидкістю утворення глутатіон-S-кон'югатів між GSH і 1-хлор-2,4-динітробензолом (ХДНБ). Збільшення концентрації кон'югатів у ході реакції реєструють спектрофотометрично при довжині хвилі 340 нм (максимум поглинання глутатіон-S-ХДНБ).

Для оцінки антиоксидантної активності (АОА) за гальмуванням нітрозуючого стресу визначали ступінь гальмування продуктів окислювальної модифікації білку – АФГ, КФГ в пробах [7].

Нітротирозин є специфічним маркером окислювального стресу. Його визначали в гомогенаті серця твердофазним імуносорбентним методом за набором фірми ELISA та виражали в нм/г тканини. Дослідження, проведені на відібраних 11 сполуках – похідних 1,2,4-триазолу - 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіокарбонових кислот та їх солях.

Достовірність відмінностей між експериментальними групами оцінювали за допомогою t-критерію Стьюдента та U-критерію Уїтні-Манна. Для всіх видів аналізу статистично значимими

вважали відмінності при $p \leq 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення

Встановлено, що додавання вказаного токсичного агента (DNIC) викликало розвиток нітрозуючого та окисдативного стресу. Про це свідчить підвищення маркерів окисного пошкодження білків – альдегідфенілгідрозонів (АФГ) та кетонфенілгідрозонів (КФГ), а також збільшення вмісту нітротирозину (табл. 1 – 3). Так, встановлено підвищення на 93,3% рівня АФГ у нейрональній суспензії на 60 хвилину інкубації. Внесення до інкубаційного середовища досліджуваних сполук показало наявність у них здатності обмежувати реакції окисдативного стресу, що спричинені додаванням DNIC. Найбільш активними у цьому відношенні виявилися сполуки під робочим шифром 1.2 (тіотриазолін) та 1.11 (ангіолін), які обмежували окисну деструкцію білків і накопичення їх альдегідних похідних на 35,9 та 41,5% відповідно. Серед інших сполук досить активними виявилися сполуки з шифром 1.6 (на 30,3%), 1.7 (на 33,8%) та 1.9 (на 28,3%). Наявна антиоксидантна активність у 5 перерахованих сполуках підтверджується статистично значимими отриманими результатами (табл. 1). Всі використані сполуки, окрім 1,2,4-триазолу та 1.10, за силою своєї антиоксидантної активності перевищували використані референс-препарати – метіонін, унітіол, тіосульфат натрію, дибунол та α -токоферол.

Таблиця 1
Активність похідних 3-метил-1,2,4-триазоліл-5- α -тіокарбонових кислот в суспензії нейронів *in vitro* при DNIC-індукованому стресі

№ п/п	Сполуки	Доза, мкмол/мл	АФГ, у.о./г білка	АОА, %
1	інтакт	-	6,41 ± 1,84	-
2	контроль	-	12,39 ± 1,02 [#]	-
3	1,2,4-триазол	0,38	10,31 ± 0,96	16,8
4	1.1	2,5	9,48 ± 0,58	23,5
5	1.2 (тіотриазолін)	2,5	7,94 ± 0,92*	35,9
6	1.3	0,38	9,97 ± 0,84	19,5
7	1.4	0,38	9,06 ± 0,86	26,9
8	1.5	2,5	9,63 ± 0,77	22,3
9	1.6	0,38	8,64 ± 0,91*	30,3
10	1.7	2,5	8,2 ± 1,05*	33,8
11	1.8	2,5	9,22 ± 0,97	25,6
12	1.9	2,5	8,88 ± 0,74*	28,3
13	1.10	2,5	10,46 ± 1,03	15,6
14	1.11 (ангіолін)	2,5	7,25 ± 0,84*	41,5
15	метіонін	0,78	9,91 ± 0,93	20,0
16	унітіол	0,78	9,86 ± 0,81	20,4
17	тіосульфат натрію	15,6	10,2 ± 1,18	17,7
18	дибунол	3,0	9,46 ± 0,92	23,6
19	α -токоферол	2,5	9,81 ± 0,88	20,8

Примітка: # - $p < 0,05$ – статистична достовірність змін між показниками в контрольній і інтактній групах
* – $p < 0,05$ – статистична достовірність змін між показниками в контрольних і дослідних групах

Паралельно з накопиченням альдегідних похідних, спостерігалось зростання кетонфенілгідрозонів (КФГ), що є пізніми маркерами окисної деструкції білкових молекул. Вміст зазначеного маркера зростав на 60 хвилині інкубації у 2,51 рази. Це підтверджує те, що під впливом активних форм кисню та азоту відбувається порушення нативної структури білків з утворенням білко-

вих агрегатів та їх розпад на окремі фрагменти. Утворення карбонільних (кетонних) похідних відбувається на більш пізніх етапах окисного стресу за рахунок кон'югації ліпідних пероксидів з амінокислотними залишками гістидину, цистеїну та лізину. Окрім карбонільних похідних, утворюються дисульфідні, сульфенових (SO), сульфінових (SO₂-), сульфонових (SO₃-) кислот та

сульфоксиду метіоніну [9]. Карбонільні похідні є більш стабільними та токсичними продуктами, аніж альдегідні, вони можуть утворюватися за рахунок амінокислотних залишків аргініну та лізину, що супроводжується виділенням одного або декількох реакційно здатних атомів азоту, які можуть включатися у реакції вільнорадикального окиснення та посилювати їх. Наявність у досліджуваних сполук здатності зменшувати інтенсивність утворення КФГ можна розглядати як найбільш значущу їх властивість в якості антиоксидантів. Значну силу антиоксидантної дії у цьому відношенні проявляли сполуки 1.2 (тіотриазолін) та сіль лізину-3-метил-1,2,4-

триазоліл-5-тіооцтової кислоти (1.11). Визначено, що вказані сполуки здатні обмежувати накопичення карбонільних похідних на 50,2% та 55,8% відповідно. Дещо меншу, але статистично значущу активність проявляли сполуки 1.6 та 1.9. Також встановлено, що кальцієва сіль лізину-3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіооцтової кислоти (1.4) знижувала вміст КФГ на 37,5% та АФГ на 26,9%. Виявлена статистично значуща активність сполуки 1.7 у відношенні АФГ не проявлялася у відношенні карбонільних похідних. Як і у попередньому дослідженні, найбільш слабкий антиоксидантний ефект притаманний речовині з шифром 1.10.

Таблиця 2
Активність похідних 3-метил-1,2,4-триазоліл-5- α -тіокарбонових кислот в суспензії нейронів *in vitro* при DNIC-індукованому стресі на 60 хвилину інкубації

№ п/п	Сполуки	Доза, мкмол/мл	КФГ, у.о./г білка	АОА, %
	інтакт	-	3,13 \pm 0,61	-
	контроль	-	7,86 \pm 1,27 [#]	-
	1,2,4-триазол	0,38	6,59 \pm 0,67	16,1
	1.1	2,5	5,32 \pm 0,82	32,3
	1.2 (тіотриазолін)	2,5	3,91 \pm 0,31*	50,2
	1.3	0,38	6,04 \pm 0,94	23,1
	1.4	0,38	4,91 \pm 0,45*	37,5
	1.5	2,5	5,55 \pm 0,39	29,4
	1.6	0,38	4,06 \pm 0,58*	48,3
	1.7	2,5	5,98 \pm 0,65	23,9
	1.8	2,5	4,96 \pm 0,72	36,9
	1.9	2,5	4,22 \pm 0,83*	46,3
	1.10	2,5	7,08 \pm 0,97	9,9
	1.11 (ангіолін)	2,5	3,47 \pm 0,53*	55,8
	метіонін	0,78	5,92 \pm 0,88	24,7
	унітіол	0,78	5,89 \pm 0,96	25,0
	тіосульфат натрію	15,6	6,11 \pm 1,04	22,2
	дибунол	3,0	5,03 \pm 0,93	36,0
	α -токоферол	2,5	5,74 \pm 0,89	26,9

Примітка: # - $p < 0,05$ – статистична достовірність змін між показниками в контрольній і інтактній групах
* – $p < 0,05$ – статистична достовірність змін між показниками в контрольних і дослідних групах

Таблиця 3
Активність похідних 3-метил-1,2,4-триазоліл-5- α -тіокарбонових кислот в суспензії нейронів *in vitro* при DNIC-індукованому стресі

№ п/п	Сполуки	Доза, мкмол/мл	Нітротирозин, нмоль/г білка	АОА, %
	інтакт	-	10,03 \pm 1,44	-
	контроль	-	39,48 \pm 3,61 [#]	-
	1,2,4-триазол	0,38	35,34 \pm 2,48	10,5
	1.1	2,5	33,63 \pm 2,69	14,8
	1.2 (тіотриазолін)	2,5	28,18 \pm 2,33*	28,6
	1.3	0,38	37,5 \pm 3,05	5,0
	1.4	0,38	29,95 \pm 2,04	24,1
	1.5	2,5	33,96 \pm 2,39	13,9
	1.6	0,38	29,85 \pm 2,17*	24,4
	1.7	2,5	28,93 \pm 2,54*	26,4
	1.8	2,5	31,22 \pm 3,11	20,9
	1.9	2,5	29,11 \pm 3,04*	26,3
	1.10	2,5	39,05 \pm 3,36	1,1
	1.11 (ангіолін)	2,5	23,54 \pm 2,08*	40,4
	метіонін	0,78	35,87 \pm 2,63	9,1
	унітіол	0,78	33,54 \pm 2,29	15,0
	тіосульфат натрію	15,6	38,91 \pm 2,94	1,4
	дибунол	3,0	32,72 \pm 2,57	17,1
	α -токоферол	2,5	34,48 \pm 2,98	12,7

Примітка: # - $p < 0,05$ – статистична достовірність змін між показниками в контрольній і інтактній групах
* – $p < 0,05$ – статистична достовірність змін між показниками в контрольних і дослідних групах

Перераховані зміни, а саме накопичення АФГ та КФГ у суспензії нейронів, свідчать про розгортання реакцій оксидативного стресу, які відбувалися на фоні підвищення маркера нітрозативного стресу – нітротирозину. Концентрація цього показника на 60 хвилині інкубації складала $39,48 \pm 3,61$ нмоль/г білка, що вище значень інтактної серії у 3,9 рази (табл. 5.3). У даний час нітротирозин розглядається не лише як маркер запалення, а й як показник синтезу оксиду азоту. До його утворення в організмі призводять декілька біохімічних шляхів, в першу чергу синтез пероксинітриту (ONOO-). Останній є сильним окислювачем та утворюється при взаємодії монооксиду азоту з молекулою кисню. Пероксинітрит здатен окислювати аміно- та тіольні групи білків, що викликає порушення їх структурної конформації та фізико-хімічних властивостей. Утворюючись у клітині, молекула пероксинітриту ініціює процеси переокиснення біліпідного шару мембран та викликає пошкодження цілісності молекул нуклеїнових кислот, в першу чергу ДНК. Суттєву роль у токсичності пероксинітриту відіграє гідроксил-радикал, який утворюється при розпаді останнього. Нітротирозин є стабільним ендogenous продуктом окиснення пероксинітриту та може використовуватися у якості маркера NO-залежних процесів пошкодження у клітині за умов оксидативного та нітрозативного стресу.

Проведеними дослідженнями встановлена здатність досліджуваних сполук виступати у якості молекул-«пасток» для монооксиду азоту та інших його реакційно-здатних активних форм, що проявлялося зменшенням вмісту нітротирозину в інкубаційному середовищі. З цього витікає, що похідні 3-метил-1,2,4-триазоліл-5- α -тіокарбонових кислот у тій чи іншій мірі здатні приймати на себе активні форми кисню та азоту, перериваючи тим самим каскад патобіохімічних процесів, які викликають пошкодження клітин. Більш активними у цьому відношенні були тіотриазолін та ангіолін. Внесення цих сполук до нейрональної суспензії з DNIC зменшувало рівень нітротирозину та обмежувало реакції утворення пероксинітриту на 28,6 та 40,4% відповідно. За силою антиоксидантної дії інші досліджені похідні, що перевищували використані препарати порівняння, можна структурувати у наступному порядку: 1.7 – 26,4%; 1.9 – 26,3%; 1.4 – 24,1%. Сполуки під робочим шифром 1.3 та 1.10 не проявили здатності обмежувати надлишок активних форм азоту, що можливо пояснюється наявністю у структурі молекули іону магнію.

Однією з антиоксидантних систем, що функціонує в організмі є тіол-дисульфідна система та найбільш активний її компонент – система глутатіону. Складові компоненти цієї системи – глутатіон, цистеїн, метіонін та інші, що мають у своїй структурі вільну тіольну групу у відновленій

формі, здатні зв'язувати активні форми оксиду азоту, тим самим зменшуючи негативний вплив останніх. Враховуючи наявність у молекулах досліджуваних сполук тіольної групи, важливим, на нашу думку, є встановлення їхньої активності стосовно підтримки тіол-дисульфідної рівноваги в клітині за умов моделювання окисного та нітрозативного стресу. Більшість тіолів здатні значно обмежувати цитотоксичність NO та його реакційних форм. Зв'язуючись з NO, тіоли утворюють комплекс у вигляді S-нітрозотіолів, які формують депо ендogenous NO. Ця реакція попереджує зв'язування молекули NO з супероксидом і попереджує утворення пероксинітриту.

Важливою біохімічною реакцією у процесі розгортання нітрозативного стресу є сполучення відновленої форми глутатіону з активними формами азоту. В таку реакцію включаються всі білкові сполуки, що містять тіолову групу. В результаті утворюються N-нітрозаміни. Неконтрольоване зростання реакційно-здатних форм оксиду азоту викликає подальше окиснення білків та ін активацію ферментів, що ще більше виснажує антиоксидантну систему клітини [8]. Проведені дослідження підтверджують, що функціонування системи глутатіону на певному рівні ефективно захищає клітину від окисного стресу.

Встановлено, що інкубування нейронів з DNIC призводило до зміщення тіол-дисульфідної рівноваги в бік окислених тіолів, про що свідчило зниження рівня відновленого глутатіону у 5,9 разів, яке відбувалося на фоні накопичення його окисненої форми у 3,6 разів. Вказане порушення тіол-дисульфідної рівноваги розгорталося на тлі зниження активності ключових ферментів системи глутатіону – Г-S-T і ГР відносно інтактних проб (табл. 6–7). Так, активність вказаних ферментів на 60 хвилину інкубації була нижчою у 5,4 та 3,4 рази відповідно стосовно інтактної серії. Біохімічною основою вказаних змін в умовах надлишку активних форм азоту є активація процесів S-нітразування та денітразування білкових молекул, які в даний час розглядаються як основа клітинного сигналіngu.

Глутатіон, який є ендogenous антиоксидантом, виконує роль «пастки» супероксид-аніону та гідроксид-аніону, обмежуючи тим самим їхню цитотоксичну дію та попереджає пошкодження клітинних мембран та внутрішньоклітинних органел. Крім перерахованого, глутатіон виконує багато інших функцій, життєво важливих для клітини. До них можна віднести детоксикаційну, структурну та регуляторну. Відновлена форма глутатіону, нарівні з іншими тіол-вмісними білками, розглядається в якості інгібітору активних форм кисню та стабілізує клітинні мембрани. У цитоплазмі клітин глутатіон зв'язує активні іони заліза та міді, попереджуючи тим самим їх включення у реакцію Фентона, при якій утворю-

ється реакційно-здатний та цитотоксичний гідроксил-радикал. За умови активації перекисного окиснення ліпідів та окисної модифікації білків, падіння рівню відновленого глутатіону з паралельним накопиченням його окисленої форми (дисульфід) відбувається фосфорилування та активація ядерного фактору NF- κ B – ключового регуляторного білка клітинної загибелі. Останнє, у свою чергу, викликає зростання швидкості транскрипції генів прозапальних цитокінів. Крім того, зниження загального вмісту SH-груп в клітині

викликає зміну проникності та біодоступності мембран для токсичного впливу продуктів окисного стресу.

Підвищення рівня окислених низькомолекулярних тіолів викликає порушення транспорту оксиду азоту та посилює утворення його активних токсичних форм – нітрозонію, нітроксилу та пероксинітриду, що також показано у нашому дослідженні (табл. 3). Накопичення перерахованих сполук у клітині викликає додаткове окиснення відновлених тіолових сполук.

Таблиця 4
Активність похідних 3-метил-1,2,4-триазоліл-5- α -тіокарбонієвих кислот в суспензії нейронів *in vitro* при DNIC-індукованому стресі

№ п/п	Сполуки	Доза, мкмол/мл	Глутатіон відновлений, ммоль/л	АОА, %
1	інтакт	-	3,06 ± 0,37	-
2	контроль	-	0,52 ± 0,14 [#]	-
3	1,2,4-триазол	0,38	0,61 ± 0,36	17,3
4	1.1	2,5	0,93 ± 0,21	78,8
5	1.2 (тіотриазолін)	2,5	1,55 ± 0,19*	2,98 p
6	1.3	0,38	0,89 ± 0,31	71,1
7	1.4	0,38	0,97 ± 0,25	86,5
8	1.5	2,5	0,81 ± 0,26	55,8
9	1.6	0,38	1,18 ± 0,45	2,3 p
10	1.7	2,5	1,31 ± 0,51	2,5 p
11	1.8	2,5	0,84 ± 0,36	61,5
12	1.9	2,5	1,06 ± 0,29	2,0 p
13	1.10	2,5	0,56 ± 0,33	7,7
14	1.11 (ангіолін)	2,5	1,68 ± 0,51*	3,2 p
15	метіонін	0,78	0,87 ± 0,85	67,3
16	унітіол	0,78	0,88 ± 0,77	69,2
17	тіосульфат натрію	15,6	0,65 ± 0,16	25,0
18	дibuнол	3,0	0,89 ± 0,19	71,1
19	α -токоферол	2,5	0,85 ± 0,26	63,4

Примітка: # - $p < 0,05$ – статистична достовірність змін між показниками в контрольній і інтактній групах
* – $p < 0,05$ – статистична достовірність змін між показниками в контрольних і дослідних групах

Таблиця 5
Активність похідних 3-метил-1,2,4-триазоліл-5- α -тіокарбонієвих кислот в суспензії нейронів *in vitro* при DNIC-індукованому стресі

№ п/п	Сполуки	Доза, мкмол/мл	Глутатіон окислений, ммоль/л	АОА, %
1	інтакт	-	0,129 ± 0,022	-
2	контроль	-	0,471 ± 0,092 [#]	-
3	1,2,4-триазол	0,38	0,405 ± 0,083	14,0
4	1.1	2,5	0,341 ± 0,076	27,6
5	1.2 (тіотриазолін)	2,5	0,168 ± 0,031*	64,3
6	1.3	0,38	0,385 ± 0,069	18,2
7	1.4	0,38	0,285 ± 0,054	39,5
8	1.5	2,5	0,349 ± 0,082	25,9
9	1.6	0,38	0,227 ± 0,056*	51,8
10	1.7	2,5	0,204 ± 0,036*	56,7
11	1.8	2,5	0,312 ± 0,049	31,8
12	1.9	2,5	0,239 ± 0,055	49,2
13	1.10	2,5	0,428 ± 0,067	9,1
14	1.11 (ангіолін)	2,5	0,143 ± 0,032*	69,6
15	метіонін	0,78	0,371 ± 0,087	21,2
16	унітіол	0,78	0,369 ± 0,067	21,6
17	тіосульфат натрію	15,6	0,391 ± 0,072	17,0
18	дibuнол	3,0	0,336 ± 0,069	28,7
19	α -токоферол	2,5	0,377 ± 0,071	19,9

Примітка: # - $p < 0,05$ – статистична достовірність змін між показниками в контрольній і інтактній групах
* – $p < 0,05$ – статистична достовірність змін між показниками в контрольних і дослідних групах

Таблиця 6
Активність похідних 3-метил-1,2,4-триазоліл-5- α -тіокарбонових кислот в суспензії нейронів *in vitro* при DNIC-індукованому стресі

№ п/п	Сполуки	Доза, мкмол/мл	Г-S-T, ммоль/ (хв.* г білка)	АОА, %
1	інтакт	-	29,11 \pm 2,18	-
2	контроль	-	5,43 \pm 1,19 [#]	-
3	1,2,4-триазол	0,38	6,06 \pm 1,36	11,6
4	1.1	2,5	9,36 \pm 1,54	72,4
5	1.2 (тіотриазолін)	2,5	18,84 \pm 2,68*	3,5 р
6	1.3	0,38	6,37 \pm 1,55	17,3
7	1.4	0,38	13,66 \pm 2,06*	2,5 р
8	1.5	2,5	8,23 \pm 1,74	51,6
9	1.6	0,38	15,04 \pm 2,26*	2,8 р
10	1.7	2,5	16,26 \pm 2,37*	3,0 р
11	1.8	2,5	12,31 \pm 1,83*	2,3 р
12	1.9	2,5	12,32 \pm 1,79*	2,2 р
13	1.10	2,5	6,08 \pm 1,09	12,0
14	1.11 (ангіолін)	2,5	20,3 \pm 1,43*	3,7 р
15	метіонін	0,78	8,56 \pm 1,45	57,6
16	унітіол	0,78	8,61 \pm 1,52	58,6
17	тіосульфат натрію	15,6	7,67 \pm 1,69	41,2
18	дибунол	3,0	10,52 \pm 2,06	1,9 р
19	α -токоферол	2,5	9,44 \pm 1,73	73,8

Примітка: # - $p < 0,05$ – статистична достовірність змін між показниками в контрольній і інтактній групах
* – $p < 0,05$ – статистична достовірність змін між показниками в контрольних і дослідних групах

Таблиця 7
Активність похідних 3-метил-1,2,4-триазоліл-5- α -тіокарбонових кислот в суспензії нейронів *in vitro* при DNIC-індукованому стресі

№ п/п	Сполуки	Доза, мкмол/мл	ГР, ммоль/(хв.* г білка)	АОА, %
1	інтакт	-	14,85 \pm 2,12	-
2	контроль	-	4,38 \pm 0,95 [#]	-
3	1,2,4-триазол	0,38	5,41 \pm 0,88	23,5
4	1.1	2,5	6,02 \pm 0,96	37,4
5	1.2 (тіотриазолін)	2,5	10,06 \pm 1,06*	2,3 р
6	1.3	0,38	5,54 \pm 1,11	26,5
7	1.4	0,38	7,01 \pm 0,78*	60,0
8	1.5	2,5	5,96 \pm 0,69	36,1
9	1.6	0,38	8,42 \pm 0,56*	92,2
10	1.7	2,5	8,51 \pm 0,77*	94,3
11	1.8	2,5	7,22 \pm 1,03	64,8
12	1.9	2,5	7,66 \pm 0,93*	74,9
13	1.10	2,5	5,13 \pm 0,42	17,1
14	1.11 (ангіолін)	2,5	11,69 \pm 0,83*	2,7 р
15	метіонін	0,78	5,91 \pm 0,89	34,9
16	унітіол	0,78	5,77 \pm 0,84	31,7
17	тіосульфат натрію	15,6	5,47 \pm 0,96	24,9
18	дибунол	3,0	6,51 \pm 0,71	48,6
19	α -токоферол	2,5	5,59 \pm 0,75	27,6

Примітка: # - $p < 0,05$ – статистична достовірність змін між показниками в контрольній і інтактній групах
* – $p < 0,05$ – статистична достовірність змін між показниками в контрольних і дослідних групах

Встановлена нашими дослідженнями здатність деяких досліджуваних сполук виступати в ролі молекул-«пасток» вільних радикалів та чинити модулюючу дію стосовно тіол-дисульфідної рівноваги в клітинах є найбільш важливим проявом їхнього антиоксидантного ефекту. Збільшення функціональності системи глутатіону, а також пов'язаних з його обміном ферментів – глутатіон-редуктази та глутатіон-S-трансферази, при внесенні до інкубаційного середовища похідних 1,2,4-триазолу – 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіокарбонових кислот та їх солей захищає клітини від активних форм кисню та продуктів перекисного окиснення [3;5].

Найбільш активними у цьому відношенні виявилися тіотриазолін (1.2) та ангіолін (1.11). Вка-

зані сполуки в досліді *in vitro* обмежували не лише окисну модифікацію білків (табл. 1–2), а й завдяки модуляції патобіохімічних реакцій окисного стресу сприяли обмеженню окисної модифікації ферментів, зберігаючи їхню функціональну активність. Так, внесення тіотриазоліну викликало збереження активності глутатіон-S-трансферази у 3,5 разів, а глутатіон-редуктази – у 2,3 рази. Ангіолін чинив у даному відношенні більш виражену дію та підвищував активність вказаних ферментів у 3,7 та 2,7 разів відповідно, у порівнянні з показниками активності в контрольній серії. Також досить активними при вивченні здатності підтримувати тіол-дисульфідну рівновагу виявилися сполуки з шифром 1.6, 1.7, 1.8, 1.9 (табл. 6 – 7).

Суттєве падіння активності Г-S-T може відігравати значну роль при активації процесів та перетворень, які спрямовують клітину до запрограмованої загибелі (апоптозу). Активність цього ферменту разом з підтриманням на певному рівні відновленої форми глутатіону відіграє ключову роль у переключенні некротичної гибелі на некроз. Перераховані патобіохімічні механізми, які протікають у клітині, а також отримані нами дані підтверджують захисну роль відновленої форми глутатіону та підтримка тиол-дисульфідної рівноваги завдяки внесенню тиолвмісних сполук до нейрональної суспензії.

Висновки

1. В умовах оксидативного та нітрозативного стресу у суспензії нейронів зростає вміст маркерів окисного пошкодження білків – АФГ на 93,3%, КФГ в 2,51 рази на 60 хвилині, маркерів нітрозуючого стресу нітротирозину у 3,99 рази та окисненої форми глутатіону у 3,6 рази. Порушення тиол-дисульфідної рівноваги відбувалося на тлі пониження активності ключових ферментів системи глутатіону – глутатіон-S-трансферази в 5,4 рази, глутатіонредуктази в 3,4 рази та відновленої форми глутатіону в 5,9 разів.

2. Тиолвміщуючі сполуки при додаванні до нейрональної суспензії в інкубаційному середовищі обмежували реакції оксидативного стресу, збільшуючи активність глутатіон-S-трансферази, глутатіонредуктази, вміст відновленого глутатіону, понижуючи рівень маркерів окислювального пошкодження білків АФГ, КФГ, нітротирозину та окисненого глутатіону. Найбільш активними у

цьому відновленні виявили сполуки під робочим шифром 1,2 (тіотриазолін) та 1,11 (ангіолін).

Перспективи подальших досліджень

Планується експериментально порівняти вплив ангіоліну з іншими метаболітотропними засобами на фізичну працездатність.

Література

1. Нейропротекция и нейропластичность / [И. Ф. Беленичев, В. И. Черный, Е. А. Нагорна и др.]. – Киев: Логос, 2015. – 512 с.
2. Горбачова С.В. Порушення функціонування сполученої системи відновлені тиолі-оксид азоту при гострому порушенні мозкового кровообігу та можливі шляхи їх корекції / С. В. Горбачова, І. Ф. Беленичев, Л. І. Кучеренко // Медична та клінічна хімія. – 2015. – Т. 17, № 4. – С. 63-67.
3. Горожанская Э. Г. Содержание глутатиона и активность глутатион-S-трансферазы как фактор прогноза эффективности лекарственной терапии больных раком яичников / Э.Г. Горожанская, В.Б. Ларионова, Г.Н. Зубрихина // Рос. онкол. журн. – 2002. – № 5. – С. 29-33.
4. Завгородняя А. Н. Эндотелиальные механизмы патогенеза цереброваскулярной патологии / А. Н. Завгородняя, В. А. Малахов // Укр. мед. часопис. – 2006. – № 2. – С. 32-39.
5. Калинина Е.В. Роль глутатиона, глутатионтрансферазы и глутаредоксина в регуляции редокс-зависимых процессов / Е.В. Калинина, Н.Н. Чернов, М.Д. Новичкова // Успехи биол.наук. – 2014. – Т. 54. – С. 299-348
6. Мазур И. А. Тиотриазолин: фармакологические аспекты и клиническое применение / И. А. Мазур, Н. А. Волошин, И. С. Чекман. – Запорожье, 2005. – 160 с.
7. Чекман І.С. Доклінічне вивчення специфічної активності потенційних лікарських засобів первинної та вторинної нейропротекції: метод. рек. / І. С. Чекман, І.Ф. Беленичев, О.О. Нагорна [та ін.]. – Київ : Юстон, 2016. – 92 с.
8. Belenichev I. F. TheThiol-Disulfide Balance and the Nitric Oxide System in the Brain Tissue of Rats Subjected to Experimental Acute Impairment of Cerebral Blood Flow: The Therapeutic Effects of Nootropic Drugs / I. F. Belenichev, S. V. Gorbacheva, N.V. Bukhtiyarova // Neurochemical Journal. – 2014. – Vol. 8, № 1. – P. 24-27.
9. Guo S. Specific inhibition of hypoxia inducible factor 1 exacerbates cell injury induced by in vitro ischemia through deteriorating cellular redox environment / S. Guo, M. Miyake, K.J. Liu [et al] // Journal of neurochemistry. – 2009. – Vol. 108 – P. 1309-1321.

Реферат

ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ 1,2,4-ТРИАЗОЛА НА СОВМЕЩЕННЫЕ СИСТЕМЫ: ВОССТАНОВЛЕННЫЕ ТИОЛЫ/NO IN VITRO
Нагорная Е.А.

Ключевые слова: тиолсодержащие соединения, нитрозирующий, оксидативный стресс, маркеры окислительного повреждения белков, тиол-дисульфидная система, система оксида азота.

Проводили исследования антиоксидантных свойств и влияния на тиол-дисульфитную систему суспензии нейронов в экспериментах *in vitro* в условиях моделирования оксидативного и нитрозирующего стресса путем внесения в инкубационную среду динитрозильного комплекса железа в токсической концентрации 250 мкмоль/л согласно Методическим рекомендациям ДЭЦ МЗ Украины. При нитрозирующем оксидативном стрессе установили в нейрональной суспензии повышение содержания показателей окислительной модификации белков (АФГ, КФГ), окисленного глутатиона, нитротирозина и понижение антиоксидантной активности, активности глутатионредуктази, глутатион-S-трансферазы и уровня восстановленного глутатиона. Внесение в нейрональную суспензию 11 тиолсодержащих соединений показало, что все используемые соединения, за исключением двух, по антиоксидантному действию превышали референт-препараты – метионин, унитиол, тиосульфат натрия, дибунол, альфа-токоферол. Тиолсодержащие соединения понижали содержание нитротирозина, стабильного эндогенного продукта окисления пероксинитрита, что используется в качестве маркера NO-зависимого повреждения. Тиолсодержащие соединения снижали содержание окисленного глутатиона и повышали восстановленного, который рассматривается как ингибитор активных форм кислорода. Тиолсодержащие соединения, особенно тиотриазолин и ангиолин, сохраняли активность глутатион-S-трансферазы и глутатионредуктазы, что подтверждает их антиоксидантное действие.

Summary

INFLUENCE OF 1,2,4-TRIAZOL DERIVATIVES ON COMBINATIVE SYSTEMS: REDUCED THIOLS/NO IN VITRO

Nagornaya Ye.A.

Key words: thiol-containing compounds, nitro-oxidative stress, markers of protein oxidative damage, thiol disulfide system, nitric oxide system.

It has been found out that the triazol derivative thiotriazolium possesses cardio-, neuro-, hepatoprotective action. It has been shown that functional disturbances are connected with endothelial dysfunction and the changing in thiol-disulfide system markers and the nitric oxide system. The aim of the study is to carry out screening of 1, 2, 4-triazole derivatives by their antioxidant action and influence on the thiol-disulfide neuron system in oxidative and nitrosative stress. We studied antioxidant properties and effects on the thiol-disulfite system of neuron suspension in experiments in vitro by modelling of oxidative and nitro-oxidative stress by introducing the iron dinitrosyl complex in a toxic concentration of 250 mmol/l into the incubation medium according to the Methodological Recommendations of the Ukrainian Ministry of Public Health. During nitro-oxidative stress, we found an increase in the content of oxidative modification parameters of proteins (APG, KFG), oxidized glutathione, nitrotyrosine and reduction of antioxidant activity, glutathione reductase activity, glutathione-S-transferase and the level of reduced glutathione in the neuronal suspension. The introduction of 11 thiol-containing compounds into the neuronal suspension showed that all the compounds used, with the exception of two, had antioxidant effects exceeding the reference drugs as methionine, unitiol, sodium thiosulfate, dibunol, and alpha-tocopherol. Thiol-containing compounds reduced the content of nitrotyrosin, a stable endogenous oxidation product of peroxyxynitrite, which is used as a marker for NO-dependent damage. Thiol-containing compounds lowered the content of oxidized glutathione and increased the content of reduced oxidized glutathione, which is considered as an inhibitor of reactive oxygen species. Thiol-containing compounds, especially thiotriazolin and angiolin, retained the activity of glutathione-S-transferase and glutathione reductase that confirms their antioxidant effect

УДК 611.441:616-001.16-092.9:572.087

Рыкова Ю. А., Шупер В. А., Шупер С. В., Гордийчук Д. А.

ХАРАКТЕРИСТИКА МАССЫ И ДЛИНЫ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КРЫС РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ НА ОРГАНИЗМ ХРОНИЧЕСКОЙ ЭКЗОГЕННОЙ ГИПЕРТЕРМИИ СРЕДНЕЙ СТЕПЕНИ

Харьковский национальный медицинский университет

Экспериментальное исследование проведено на 60 белых линейных крысах-самцах, возрастом 12 недель и весом 180-230г. Животных этой серии подразделяли на группы в зависимости от действующих на них агентов. Первую группу (1) составили контрольные крысы, которые также находились в термокамере в течение 5 часов при температуре 21°C. Во вторую группу (2) вошли животные, подвергшиеся хронической гипертермии средней тяжести (42,0-43,1°C). Гипертермию моделировали с 8 часов утра до 13.00 (по 5 часов ежедневно) на протяжении 60 дней. После сеансов гипертермии на 1, 7, 15, 30 и 60 сутки животных декапитировали из эксперимента под эфирным наркозом. Непосредственно после декапитации щитовидную железу извлекали вместе с трахео-гортанным комплексом, осуществляли препаровку щитовидной железы, после чего взвешивали ее на аналитических весах ВЛА-200 с точностью до 1 мг. Анализ цифровых данных проводили с помощью компьютерной программы для органо- и морфометрических исследований. Результаты параметров массы щитовидной железы обрабатывали с помощью статистических программ, достоверной считали вероятность ошибки менее 5% (p<0,05). Исследована динамика показателей массы и длины щитовидной железы крыс после длительного воздействия на организм хронической гипертермии. Выявлено достоверное снижение массы органа и уменьшение длины долей в соответствии с интактными животными.

Ключевые слова: щитовидная железа, масса, длина, хроническая гипертермия, крысы.

Данная работа выполнена в соответствии с планом научных исследований Харьковского национального медицинского университета МОЗ Украины (ХНМУ) и является составной частью научно-исследовательской темы кафедры анатомии человека «Морфологические особенности органов и систем тела человека на этапах онтогенеза» № государственной регистрации 0114U004149.

До настоящего времени человеку в условиях труда всё ещё приходится, и довольно часто, сталкиваться с неблагоприятным действием высоких температур. В металлургической и металлообрабатывающей промышленности, в угольной и горнорудной, в машиностроительной и химической, в стекольной и пищевой, на железнодорожном и водном транспорте, в авиации и

флоте — вот далеко не полный перечень отраслей народного хозяйства, где высокая температура — 40-80°, а нередко и выше 100°, выступает в качестве неблагоприятного фактора производственного микроклимата [1;2;3;4]. В Украине в связи с неблагоприятной экологической ситуацией определяется дальнейший рост нарушений тиреоидной функции. Для понимания сущ-