

І. Г. Максимова

Харківський національний медичний університет, м. Харків

## ВПЛИВ СУМІШЕЙ ІМІДАЗОЛІНІВ НА АКТИВНІСТЬ НАДФН-ЦИТОХРОМ С РЕДУКТАЗИ ТА ВМІСТ ЦИТОХРОМУ P-450 У МІКРОСОМАЛЬНІЙ ФРАКЦІЇ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ

У роботі за допомогою спектрофотометричного методу визначено активність ферментів у мікросомальній фракції печінки щурів на 30-ту добу впливу промислових хімічних забруднювачів довкілля – сумішей імідазолінів у дозах 1/10 і 1/100 ДЛ50, що є необхідним для всебічного розкриття біохімічних механізмів мембранотропної дії. Імідазоліновмісні суміші з алкільними радикалами С7-9 і С9-15 у дозі 1/10 ДЛ50 викликають інактивацію НАДФН-редуктазної системи мікросом, що підтверджується зниженням активності НАДФН-цитохром с редуктази та вмісту цитохрому P-450. Тривалий вплив сумішей у дозі 1/100 ДЛ50, навпаки, призводить до її активації, що підтверджується підвищенням активності НАДФН-цитохром с редуктази та вмісту цитохрому P-450. Виявлені зміни є однією з патогенетичних ланок біохімічних механізмів мембранотропної дії сумішей імідазолінів, що необхідно враховувати при розробленні засобів їх корекції.

**Ключові слова:** суміші імідазолінів, щури, мікросоми, НАДФН-редуктаза, цитохром P-450.

*Робота виконана у рамках НДР «Вивчення механізмів біологічної дії простих поліефірів у зв'язку з проблемою охорони навколишнього середовища» (номер держреєстрації 0110U001812).*

Актуальною проблемою сучасної медицини є розкриття механізмів розвитку патологічних процесів при дії на організм хімічних факторів довкілля [2, 8]. До поширених промислових хімічних забруднювачів відносяться суміші імідазолінів (СІМ), які характеризуються досить значними об'ємами синтезу, широким використанням у різних галузях народного господарства (як основа промислового випуску миючих засобів, антистатиків, антикорозійних препаратів, адгезійних добавок тощо), надходженням до джерел питного водопостачання та завдяки цьому можливим впливом на здоров'я людини [5, 9, 12]. Проте, біохімічні механізми дії СІМ на організм вивчено недостатньо, зокрема, вплив на первинні мішені їх атаки – клітинні мембрани. Функції останніх є життєво визначальними: їх порушення за умов впливу хімічних факторів або індукує ряд відповідних реакцій, або призводить до загибелі клітин [3].

Доведено, що мікросоми здатні зберігати більшість морфологічних та функціональних характеристик інтактних мембран, включаючи властивості шорсткої та гладкої поверхні відповідно у шорсткого та гладкого ендоплазматичного ретикулума. Шорсткі мікросоми в основному пов'язані з синтезом, а гладкі - відносно багаті ферментами, відповідальними за окислювальний метаболізм чужорідних ліпофільних хімічних сполук, а також сполук, що містять ліпофільні та гідрофільні групи (до них належать СІМ) [4, 10]. До числа основних ферментів відносяться НАДФН-цитохром P-450 редуктаза (оскільки цитохром с може слугувати акцептором електрона, цей фермент позначають ще як НАДФН-цитохром с редуктаза) та цитохром P-450. Активність мембранозв'язаних ферментів за умов тривалого впливу СІМ вивчено недостатньо, а саме їх урахування є необхідним для всебічного розкриття механізмів дії на організм та розроблення засобів їх корекції.

**Метою** роботи було вивчення активності НАДФН-цитохром с редуктази та вмісту цитохрому P-450 у мікросомальній фракції печінки щурів на 30-ту добу дії сумішей імідазолінів у дозах 1/10 і 1/100 ДЛ50.

**Матеріал та методи дослідження.** У роботі використано зразки СІМ з алкільними радикалами С7-9 (СІМ7-9) і С9-15 (СІМ9-15). Експерименти проведено на статевозрілих щурах-самцях лінії WAG, масою (180-220) г. Утримання та маніпуляції над тваринами виконувались відповідно до основних принципів у сфері біоетики. Їх піддавали пероральній затравці за допомогою зонда водними розчинами сумішей щоденно одноразово протягом 30 днів у дозах 1/10 і 1/100 ДЛ50. Середньолетальні дози (ДЛ50) становили: для СІМ7-9 – 1,8 г/кг; СІМ9-15 – 5,0 г/кг маси тіла. Тваринам контрольної групи вводили відповідні об'єми питної води. Дослідження показників проводили через 30 днів після початку експерименту. У кожній групі було по 15 тварин. Забій проводили шляхом декапітації, попередньо анестезуючи тіопенталом натрію. Виділення мікросомальної фракції печінки щурів проводили методом диференційного центрифугування. Визначення активності НАДФН-цитохром с редуктази здійснювали у присутності акцептора електронів цитохрому с [6]. Принцип методу ґрунтується на визначенні зміни поглинання акцептора електронів при переході з окисленої форми у відновлену. Інкубаційна суміш містила

100 мкМ НАДФН, 50 мкМ цитохром с, 330 мкМ NaCN, 100 мМ трис-НСІ буфер (рН 7,4), 40 мкг білка мікросом. Загальний об'єм інкубаційної суміші складав 3 мл. Вимірювання швидкості відновлення цитохрому с проводили на двопробеному спектрофотометрі «Specord UV VIS» при 30°C і довжині хвилі 550 нм. Активність ферменту розраховували за допомогою коефіцієнта молярної екстинкції цитохрому с, що дорівнював  $18,5 \cdot 10^3 \text{ см}^{-1} \text{ M}^{-1}$ . Кількісне визначення цитохрому Р-450 проводили спектрофотометричним методом за допомогою двопробенового реєструючого спектрофотометра «Specord UV VIS» [6], вимірюючи величину поглинання комплексу відновленого цитохрому Р-450 з монооксидом вуглецю при довжині хвилі 450 нм. Статистичний аналіз даних проводили з використанням комп'ютерного пакета прикладних програм для обробки статистичної інформації Statistica 6.1 (StatSoft, Inc., США). Первинне статистичне опрацювання даних починали з перевірки припущення про відповідність вибірок закону гаусівського розподілу. Кількісні ознаки, що мали нормальний розподіл, описували параметричними характеристиками - середнім значенням показника (М) та середнім квадратичним відхиленням (s); у разі відсутності нормального розподілу непараметричними - медіаною (Me) та інтерквартильним розмахом. Для порівняння двох нормальних розподілів застосовували t-критерій Стьюдента. Якщо принаймні один з розподілів не був нормальним, то для порівняння незалежних вибірок застосовували критерій Манна-Уїтні. За критичний рівень значущості при перевірці статистичних гіпотез приймали  $p < 0,05$ .

**Результати дослідження та їх обговорення.** Вплив досліджуваних СІМ у дозі 1/10 ДЛІ50 призводив на 30-ту добу спостереження до статистично значущого ( $p < 0,001$ ), порівняно з контролем, зниження активності НАДФН-цитохром с редуктази у мікросомальній фракції печінки щурів (табл.). Найбільш виразним цей вплив був для СІМ7-9 (на 35 %), ніж для СІМ9-15 (лише на 17 %). У дозі 1/100 ДЛІ50 суміші імідазолінів викликали протилежні результати – підвищення активності НАДФН-цитохром с редуктази мікросом гепатоцитів: на 46 % ( $p < 0,001$ ) у випадку СІМ7-9 та 20 % ( $p = 0,001$ ) у випадку СІМ9-15. Така сама динаміка змін спостерігалася й для вмісту цитохрому Р-450 (використовуючи термін «цитохром Р-450», мається на увазі вся різноманітність варіантів цього білка, тому що відомо існування множинних форм цитохрому Р-450 [10]) (табл.). Останній при дії СІМ7-9 у дозі 1/10 ДЛІ50 статистично значуще ( $p = 0,049$ ), по відношенню до контрольної групи тварин, знижувався на 35 %, а у дозі 1/100 ДЛІ50 – підвищувався на 38 %. Для СІМ9-15 характерна аналогічна динаміка змін, але при порівнянні з контролем, вони виявлялися недостовірними ( $p = 0,135$  та  $p = 0,18$ ).

Таблиця

**Активність НАДФН-цитохром с редуктази та вміст цитохрому Р-450 у мікросомальній фракції печінки щурів на 30-ту добу впливу імідазолінвмісних органічних сумішей (n=15; Me [25%; 75%] або  $M \pm s$ )**

| Суміш    | НАДФН-цитохром с редуктаза, нмоль цитохрому с/хв·мг білка |                               | Цитохром Р-450, нмоль/мг білка  |                                  |
|----------|---|-------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
|          | доза, ДЛІ50   |                               |                                 |                                  |
|          | 1/10  | 1/100                         | 1/10                            | 1/100                            |
| СІМ7-9   | 125,0±16,6<br>$p < 0,001$                                 | 280 [235; 326]<br>$p < 0,001$ | 0,81 [0,72; 1,1]<br>$p = 0,049$ | 1,72 [0,98; 2,32]<br>$p = 0,049$ |
| СІМ9-15  | 160,1±9,93<br>$p < 0,001$                                 | 230 [210; 267]<br>$p = 0,001$ | 0,95±0,272<br>$p = 0,135$       | 1,54±0,468<br>$p = 0,18$         |
| Контроль | 192,3±19,6  |                               | 1,25±0,551                      |                                  |

Примітка: p – рівень значущості порівняно з контролем.

Таким чином, досліджувані органічні суміші у дозі 1/100 ДЛІ50 призводять до зростання активності НАДФН-редуктазної системи мікросомальної фракції печінки щурів та монооксигеназної системи у цілому. Слід акцентувати увагу на той факт, що монооксигеназна система є істотним джерелом утворення активних форм кисню [11]. Перекисне окислення ліпідів (ПОЛ) є ще одним типом реакцій окислення у мембранах ендоплазматичного ретикулума. При цьому доведено, що НАДФН-цитохром с редуктаза є початковою ланкою як в реакціях гідроксилування, так і в процесах ПОЛ [1]. Останні є також вагомим фактором порушення структурно-функціонального стану клітинних мембран. За умов дії СІМ у дозі 1/10 ДЛІ50 спостерігається протилежний ефект. Пригнічення активності монооксигеназної системи печінки щурів у цьому випадку може бути пов'язано з дефіцитом НАДФН – як основного джерела для функціонування НАДФН-цитохром с редуктази у мікросомах. Електронотransпортні системи мікросом та мітохондрій знаходяться у постійному оновленні білкових ферментних комплексів, метаболічна активність яких у значній мірі залежить від зміни фізіологічних умов та патологічних

процесів у клітинах [7]. Цей синтез потребує значного використання АТФ та НАДФ. Мітохондріальна та мікосомальна системи конкурують за зв'язок з НАДФН у процесів його використання для вільного мітохондріального дихання та спряженого функціонування систем цитохрому Р-450 гладкого ендоплазматичного ретикулума [13]. У цілому виявлені зміни активності мембранозв'язаних ферментних комплексів є результатом мембранотропних ефектів СІМ.

### Нісумок

Узагальнюючи отримані результати, можна зробити наступні висновки. 1. Тривала інтоксикація організму щурів СІМ у дозі 1/10 ДЛ50 викликає інактивацію НАДФН-редуктазної системи мікосомальної фракції печінки щурів, що підтверджується зниженням активності НАДФН-цитохром с редуктази та вмісту цитохрому Р-450. 2. Тривала дія СІМ у дозі 1/100 ДЛ50 призводить до підвищення активності НАДФН-цитохром с редуктази та вмісту цитохрому Р-450 у мікосомальній фракції печінки щурів, що свідчить про активацію процесів мікосомального окислення. 3. Зміни активності НАДФН-редуктазної системи мікосомальної фракції печінки щурів є однією з патогенетичних ланок біохімічних механізмів мембранотропної дії СІМ, що необхідно враховувати при розробленні засобів їх корекції.

*Перспективи подальших досліджень.* У подальшому планується провести комплекс досліджень, спрямованих на обґрунтування біохімічних механізмів мембранотропної дії СІМ, зокрема оцінку активності рецепторних мембранозв'язаних комплексів.

### Список літератури

1. Арчаков А.И. Микросомальное окисление / А.И. Арчаков // – М.: Наука, -1975. – 327 с.
2. Аманжол И.А. Реакция организма на воздействие вредных производ-ственных факторов: оценка профессионального риска / И.А. Аманжол, З.Т. Мухаметжанова, Д.С. Абиатаев // – Lambert Academic Publishing, - 2013. – 116 с.
3. Болдырев А.А. Биомембранология / А.А. Болдырев, Е.И. Кяйвярйянен, В.А. Илюха // – Петрозаводск -: КарНЦ РАН, - 2006. – 226 с.
4. Граник В.Г. Метаболизм экзогенных соединений. Лекарственные средства и другие ксенобіотики / В.Г. Гранник // – М.: Вузовская книга, -2006. - 528 с.
5. Жуков В.И. Эколого-гигиеническая характеристика азотсодержащих поверхностно-активных веществ как загрязнителей водоемов / В.И. Жуков, В.В. Мясоедов, С.А. Стеценко [и др.] // – Х. : Торнадо, -2000. – 180 с.
6. Орехович В. Н. Современные методы в биохимии / В. Н. Орехович // - М.: Медицина, -1977. - 371 с.
7. Скулачев В.П. Энергетика биологических мембран / В.П. Скулачев. – М.: Наука, -1989. – 288 с.
8. Цудзевич Б.О. Ксенобіотики: накопичення, детоксикація та виведення з живих організмів / Б.О. Цудзевич, О.Б. Столяр, І.В. Калініна [и др.] // – Тернопіль: Видавництво ТНТУ ім. І. Пулюя, -2012. – 384 с.
9. Bajpai D. Fatty imidazolines, chemistry, synthesis, properties and their industrial application / D. Bajpai, V.K. Tyagi // Journal of Oleo Science. – 2006. – Vol. 55, № 7. – P. 319-329.
10. Guengerich F.P. Cytochrome p450 and chemical toxicology / F.P. Guengerich // Chemical Research in toxicology. – 2008. – Vol. 21 (1). – P. 70-83.
11. Karusina I.I. Hydrogen peroxide-mediated inactivation of microosomal cytochrom P-450 during monooxygenase reactions / I.I. Karusina, A.I. Archakov // Free Rad. Biol. Med. - 1994. – Vol. 17, № 6. – P. 557-567.
12. Tyagi R. Imidazoline and its derivatives: an overview / R. Tyagi, V.K. Tyagi, S.K. Pandey // Journal of Oleo Science. – 2007. – Vol. 56, № 5. – P. 211-222.
13. Villenve J. Cytochrome H-450 and liver diseases / J. Villenve, V. Pichette // Curr. Drug. Metab. – 2004. – Vol. 5, № 3. – P. 273-282.

### Реферати

#### ВЛИЯНИЕ СМЕСЕЙ ИМИДАЗОЛИНОВ НА АКТИВНОСТЬ НАДФН-ЦИТОХРОМ С РЕДУКТАЗЫ И СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОХРОМА Р-450 В МИКОСОМАЛЬНОЙ ФРАКЦИИ ПЕЧЕНИ КРЫС Максимова И. Г.

В работе с помощью спектрофотометрического метода определена активность ферментов в микросомальной фракции печени крыс на 30-е сутки воздействия промышленных химических загрязнителей окружающей среды – смесей имидазолинов в дозах 1/10 и 1/100 ДЛ50, что является необходимым для всестороннего раскрытия биохимических механизмов их мембранотропного действия. Имидазолинсодержащие смеси с алкильными радикалами С7-9 и С9-15 в дозе 1/10 ДЛ50 вызывают инактивацію НАДФН-редуктазної системи микросом, что подтверждается снижением активности НАДФН-цитохром с редуктазы и содержания цитохрома Р-450. Длительное воздействие

#### INFLUENCE OF IMIDAZOLINES MIXTURES ON THE ACTIVITY OF NADPH-CYTOCHROME C REDUCTASE AND CYTOCHROME P-450 IN A MICROSOMAL FRACTION OF RAT LIVER Maximova I. G.

The activity of enzymes in a microsomal fraction of rat liver on the 30th day of the effects of industrial chemical pollutants - imidazoline mixtures at doses of 1/10 and 1/100 DL50 was determined with the help of spectrophotometric method, which was necessary for the complete explanation of the biochemical mechanisms of their membrane-tropic action. Imidazoline-containing mixtures with alkyl radicals C7-9 and C9-15 at a dose of 1/10 DL50 cause inactivation of microsomal NADPH reductase system, proven by reduced activity of NADPH-cytochrome c reductase and decrease in cytochrome P-450 level. On the contrary, prolonged exposure of mixtures at a dose of 1/100 DL50 leads to its

смесей в дозі 1/100 ДЛ150, наоборот, приводить к ее активації, що підтверджується підвищенням активності НАДФН-цитохром с редуктази і содержания цитохрома Р-450. Виявлені зміни являються одним из патогенетических звеньев біохімічних механізмів мембранотропного дієвства смесей імідазолинов, що необхідно учитивать при розробці способів їх корекції.

**Ключевые слова:** смеси імідазолинов, крысы, микросомы, НАДФН-редуктаза, цитохром Р-450.

Стаття надійшла 13.03.2016 р.

УДК 615.47.014.47:617.7

activation, as evidenced by increased activity of NADPH-cytochrome c reductase and level of cytochrome P-450. The revealed changes can be considered as one of the pathogenetic links of biochemical mechanisms of the membrane-tropic action of imidazoline mixtures that need to be taken into account in the development of methods for their correction.

**Key words:** mixtures of imidazolines, rats, microsomes, NADPH reductase, cytochrome P-450.

Рецензент Запорожець Т.М.

Г. Г. Назарчук

Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова МОЗ України, м. Вінниця

## СУЧАСНІ АНТИМІКРОБНІ МАТЕРІАЛИ З ПРОЛОНГОВАНИМИ ЛІКУВАЛЬНИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ В ОФТАЛЬМОЛОГІЇ

В роботі наведені нові дані про кінетику вивільнення ДКМ з полімерного покриття нейлону моно 9/0. Показано, що ефективний місцевий протимікробний режим, створений шовним матеріалом нейлон з полімерним антимікробним покриттям, завдяки зниженню мікробної колонізації інфікованих корнеосклеральних ран в післяопераційному періоді достовірно знижує частоту розвитку післяопераційних гнійно-запальних ускладнень. Доведено, що загоєння інфікованих наскрізних ран повік, краї яких адаптовані нейлоном, імпрегнованим антимікробною композицією на основі ДКМ, перебігає без рецидиву та хронізації гнійного запалення завдяки прискореному очищенню інфікованої рани повіки від мікробного забруднення в два рази (*S. aureus* ( $1,93 \pm 0,23$ ) – ( $5,82 \pm 0,24$ ) lg КУО/мл) порівняно з використанням традиційного шовного матеріалу ( $p < 0,001$ ). Результати дослідження свідчать про перспективу застосування шовного матеріалу нейлон з антимікробним покриттям при хірургічній обробці інфікованих поранень органа зору з метою профілактики, лікування післяопераційних гнійно-запальних ускладнень.

**Ключові слова:** шовний матеріал, нейлон, декаметоксин®, корнеосклеральна рана, рана повіки, *S. aureus*.

Протягом останніх років почастишали випадки поєднаних та комбінованих важких травматичних пошкоджень ока та його допоміжного апарату. Для збереження зорових функцій та ока як органу тактика лікування таких пацієнтів передбачає застосування антибіотикотерапії, яка на сьогоднішній день недостатньо профілакує розвиток грізних інфекційних ускладнень в післяопераційному періоді. Посттравматичні гнійно-запальні ускладнення проникаючих поранень ока зустрічаються у 2,6 – 54,2% випадків, за наявності інтраокулярного стороннього тіла показник зростає до 1,3 – 61,0%, суттєво ускладнюючи перебіг репаративних процесів [1-2]. Актуальним залишається розробка нових антимікробних засобів, розширення показів та шляхів введення вже існуючих, надання пролонгованого антимікробного захисту матеріалам медичного призначення. Особливо перспективними в цьому плані є шовний матеріал, який застосовується у “вхідних воротах” інфекції для хірургічної обробки поранень ока та його допоміжного апарату.

Враховуючи зростання резистентності у мікроорганізмів до наявного арсеналу антибіотиків, варто спрямувати увагу на розширення сфери застосування антисептиків, що володіють рядом беззаперечних переваг. Вітчизняний антисептик декаметоксин (ДКМ) володіє високою активністю та широкою сферою застосування в офтальмології [3-5].

**Метою** роботи було дослідити кінетику вивільнення антисептика з шовного матеріалу нейлону, імпрегнованого антимікробною композицією декаметоксину, та його вплив на процес післяопераційного загоєння наскрізних інфікованих корнеосклеральних ран, поранень повік.

**Матеріал та методи дослідження.** Нейлон (моно) 9/0 і 6/0 зі шпательними голками імпрегнували розчином антимікробної композиції антисептика ДКМ (пат. u201205692) 10 хвилин, модуль оздоблюваної ванни 5, висушували ступінчасто на повітрі при температурі 18 – 22 °С. При цьому на шовному матеріалі утворювалась полімерна плівка, у якій утримувався ДКМ. Кінетику вивільнення ДКМ з полімерного покриття нейлону моно 9/0 (атравматичний шовний матеріал діаметром 0,044 мм, довжиною 30 см, ТУ У 331.1-30468133-001-2006) вивчали на моделі (нейлонові нитки 5/0 монофіламентні, діаметром 0,125, довжиною 70 см, ТУ У 24.4 -13725905-002-2007) у зв'язку із малим діаметром об'єкту дослідження. Моделювання можливе і достовірно при виконанні двох умов: економічність (зручність роботи з моделлю, дешевизна моделі) і традуктивність моделі (можливість перенесення результатів досліджень з моделі на оригінал) [6].

Нитка 5/0 є монониткою з гладенькою поверхнею, подібною поверхні нитки 9/0. Поверхня ниток практично дорівнює їх зовнішній поверхні, а процеси адсорбції-десорбції ДКМ на поверхні