

УДК 577.122.8

К. Дворщенко, д-р біол. наук, А. Драницина, канд. біол. наук,
Є. Торгалло, канд. біол. наук, О. Короткий, канд. біол. наук,
Т. Берегова, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ПОКАЗНИКИ ПРОТЕЇНОВОГО ОБМІНУ У КРОВІ ЩУРІВ ПРИ ВИВЧЕННІ ХРОНІЧНОЇ ТОКСИЧНОСТІ КОМПОЗИЦІЇ НА ОСНОВІ МЕЛАНІНУ

Досліджено хронічну токсичність композиції на основі меланіну на показники протеїнового обміну у сироватці крові щурів обох статей. Встановлено, що при дії меланіну у терапевтичній дозі 0,3 мг×кг⁻¹ протягом 90 діб у сироватці крові самців і самиць щурів концентрація загального білка, альбуміну, сечовини та активність аланінамінотрансферази і аспаратамінотрансферази залишається в межах контрольних значень. Показано, що при дії меланіну у десятикратній терапевтичній дозі 3 мг×кг⁻¹ протягом 90 діб у сироватці крові самиць активність аланінамінотрансферази зростає в 1,36 раза, всі інші досліджувані показники у самців та самок знаходяться на контрольному рівні.

Ключові слова: хронічна токсичність, меланін, протеїновий обмін.

Вступ. На сьогоднішній день інтерес науковців привертає до себе пошук високоефективних препаратів на основі похідних поліфенольних сполук, які можуть бути використані у лікуванні та профілактиці ряду захворювань [3, 10]. Серед них перспективне місце займають меланіни, які володіють антибактеріальними, протизапальними та антиоксидантними властивостями. До меланінів належать пігменти різноманітної структури, які в залежності від їх джерела походження поділяють на п'ять основних типів: тваринні, рослинні, грибні, бактеріальні та синтетичні [6, 7, 13]. У наших експериментах було досліджено меланін, продуцентом якого є дріжджеподібні гриби *Nadsoniella nigra* штаму Х1, що були висіяні із зразків вертикальних скель о. Галіндез (Українська Антарктична станція академік Вернадський).

Одним з перших етапів вивчення нових препаратів є проведення доклінічних досліджень на лабораторних тваринах з метою виявлення можливих загальних токсичних ефектів. Метою нашої роботи було дослідити хронічну токсичність композиції на основі меланіну на ряд показників протеїнового обміну у крові щурів.

Матеріали та методи. У роботі дотримувалися міжнародних рекомендацій стосовно проведення медико-біологічних досліджень з використанням тварин згідно Європейської конвенції (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes). У досліджах використовували 60 білих нелінійних статевозрілих щурів обох статей з початковою вагою 180-200 г, яких утримували на стандартному раціоні виварію.

Для проведення досліджень тварин було поділено на три експериментальні групи: перша – контроль: щурам вводили воду у об'ємі 1 мл×кг⁻¹ (10 самців і самок), друга – щурам вводили меланін у терапевтичній дозі 0,3 мг×кг⁻¹, розчинений у воді у об'ємі 1 мл×кг⁻¹ (10 самців і самок) та третя група – щурам вводили меланін у десятикратній терапевтичній дозі – 3 мг×кг⁻¹, розчинений у воді у об'ємі 1мл/кг (10 самців і самок). Препарати вводили щоденно протягом 90 діб. В ході експерименту кожний день проводили спостереження за загальним станом тварин, їх поведінкою та споживанням корму та води. Щотижня здійснювали загальний огляд тварин: оцінювали масу тіла щурів, вимірювали температуру, визначали стан шерстного покриву, шкірних і слизових покривів, наявність новоутворень і нехарактерних виділень, чутливості периферійних нервів. На 90-й день після початку введення композиції проводили забій

тварин. Щурів умертвляли методом транслокальної дислокації шийних хребців.

Для біохімічних досліджень використовували сироватку крові, в якій визначали наступні показники. Концентрацію альбуміну вимірювали спектрофотометрично за поглинанням продукту реакції з бромрезольовим зеленим у слабкокислому середовищі [2]. Загальний вміст білку у пробах визначали за методом Лоурі [8]. Концентрацію сечовини встановлювали діацетилмонооксимним колориметричним методом [1]. Активність аланінамінотрансферази (АлАТ) та аспаратамінотрансферази (АсАТ) визначали за методом Райтмана-Френкеля [9].

Статистичну обробку результатів дослідження проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики. Вірогідність різниці між контрольними та дослідними вимірами оцінювали методом однофакторного дисперсійного аналізу. Вірогідною вважали різницю $p < 0,05$. Дані представлено як середнє арифметичне (M) та його стандартна похибка (m): $M \pm m$.

Результати та їх обговорення. При дослідженні композиції на основі меланіну на показники протеїнового обміну визначали концентрацію протеїнів плазми (загальний білок, альбумін), вміст яких відображає функціональний стан печінки та її протеосинтетичну здатність, та концентрацію сечовини – кінцевого продукту азотистого обміну, яка дає інформацію про стан екскреторно-видільної функції нирок та детоксикаційної здатності печінки [11].

Результати біохімічних досліджень сироватки крові показали, що за умов введення меланіну щурам у терапевтичній дозі 0,3 мг×кг⁻¹ та десятикратній терапевтичній дозі 3 мг×кг⁻¹ протягом 90 діб концентрація загального білку як у самців, так і самок не змінювалась і була в межах контрольних значень (табл. 1). За даних експериментальних умов виявлено, що при дії композиції на основі меланіну у десятикратній терапевтичній дозі 3 мг×кг⁻¹ концентрація альбуміну у крові щурів самців та самиць залишається в межах фізіологічної норми (табл. 1).

Для дослідження стану функції печінки та нирок було визначено вміст сечовини, яка утворюється в гепатоцитах при знешкодженні аміаку. Аналіз вмісту сечовини у сироватці крові вказує, що введення композиції на основі меланіну у терапевтичній та десятикратній терапевтичній дозі в досліджуваній часовий інтервал суттєво не впливав на функціональну активність даних органів (табл. 1).

Таблиця 1. Показники протеїнового обміну у сироватці крові щурів при дослідженні хронічної токсичності композиції на основі меланіну, ($M \pm m$, $n=10$)

Досліджуваний параметр		Загальний білок, г × л ⁻¹	Альбумін, г × л ⁻¹	Сечовина, ммоль × л ⁻¹
Група тварин	контроль			
	самки	81,75 ± 7,96	33,42 ± 2,73	6,09 ± 5,16
	самці	81,71 ± 8,04	31,94 ± 2,61	7,76 ± 7,19
	меланін, 0,3 мг×кг ⁻¹	84,42 ± 8,27	36,31 ± 3,49	5,54 ± 5,15
	самки	87,23 ± 8,18	32,84 ± 2,82	6,47 ± 6,16
	самці	87,31 ± 8,19	38,91 ± 3,47	6,02 ± 5,48
	меланін, 3 мг×кг ⁻¹	82,67 ± 7,15	36,52 ± 2,92	7,06 ± 6,82
	самки			
	самці			

Важливими показниками ураження тканин внутрішніх органів є активність цитозольних ензимів у сироватці крові. До цієї групи належать аланінамінотрансфераза та аспартатамінотрансфераза, активність яких дозволяє визначити рівень пошкоджень та встановити комплексну реакцію органів на різноманітні терапевтичні засоби [4]. При пошкодженні або руйнуванні клітин під дією токсичних або інфекційних факторів порушується енергетичний метаболізм, що призводить до зростання проникності клітинних мембран та вивільненню ензимів у кров. Ступінь підвищення активності ензимів вказує на інтенсивність цитолітичного синдрому. Рівень активності аланінамінотрансферази є більш специфіч-

ним для уражень печінки, тоді як аспартатамінотрансферази – для пошкоджень міокарду [5, 12].

Тому при вивченні хронічної токсичності меланіну на організм щурів ми визначали активність амінотрансфераз в сироватці крові. Виявлено, що при введенні меланіну щурам-самцям у терапевтичній дозі 0,3 мг×кг⁻¹ активність аланінамінотрансферази знаходиться в межах контрольних значень, але при дії досліджуваної композиції у десятикратній терапевтичній дозі 3 мг×кг⁻¹ спостерігається збільшення активності ензиму в 1,36 раза (табл. 2). У самців за даних експериментальних умов не було виявлено суттєвих відхилень в активності аланінамінотрансферази у сироватці крові.

Таблиця 2. Активність амінотрансфераз у сироватці крові щурів при дослідженні хронічної токсичності композиції на основі меланіну, ($M \pm m$, $n=10$)

Досліджуваний параметр		Аланінамінотрансфераза, од × л ⁻¹ × мг білка ⁻¹	Аспартатамінотрансфераза, од × л ⁻¹ × мг білка ⁻¹
Група тварин	контроль		
	самки	72,21 ± 6,46	205,13 ± 18,87
	самці	69,32 ± 5,75	217,27 ± 19,42
	меланін, 0,3 мг×кг ⁻¹	73,45 ± 6,98	227,92 ± 20,79
	самки	74,21 ± 6,84	243,63 ± 22,14
	самці	97,91 ± 8,45	234,61 ± 21,85
	меланін, 3 мг×кг ⁻¹	74,75 ± 6,85	219,15 ± 20,59
	самки		
	самці		

Примітка: * - $p < 0,05$ порівняно з контролем.

При визначенні активності аспартатамінотрансферази у сироватці крові щурів обох статей як при введенні терапевтичної, так і десятикратної терапевтичної дози композиції на основі меланіну, не спостерігалось відхилень досліджуваного показника від фізіологічних значень (табл. 2).

Таким чином, на підставі проведених досліджень по вивченню хронічної дії композиції на основі меланіну можна зробити висновок, що меланін у терапевтичній дозі 0,3 мг×кг⁻¹ протягом 90 діб не впливає на функціональну активність печінки та нирок, які відповідають за протеосинтетичну, детоксикаційну та екскреторно-поглинальну функції. Також встановлено, що досліджувана композиція у терапевтичній дозі при хронічній дії на організм щурів не викликає деструктивних процесів у внутрішніх органах, зокрема в печінці, про що свідчить фізіологічний рівень у крові активності трансаміназних ензимів (АлАТ і АсАТ). Разом з тим, при дії композиції на основі меланіну у десятикратній терапевтичній дозі 3 мг×кг⁻¹ протягом 90 діб у сироватці крові спостерігаються гендерні відмінності: у самиць щурів відмічається незначне підвищення активності АлАТ, в той час як у самців всі досліджувані параметри залишаються на контрольному рівні. Отже, композиція на основі меланіну у терапевтичній дозі не виявляє токсичних властивостей по відношенню до фізіологічного функціонування організму та є безпечною у використанні.

Список використаних джерел

1. Breinek P. Determination of urea using diacetylmonooxim with out deproteinization in a sulfuric acid medium / Breinek P., Bouda J. // Vnitř. Lek. – 1970. – Vol.16, №2. – P. 188-192.

2. Doumas B. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green / Doumas B., Watson W., Biggs H. // Clin. Chim. Acta. – 1971. – Vol.31, №1. – P. 87-96.

3. Fukuchi K. Antiviral and antitumor activity of licorice root extracts / Fukuchi K., Okudaira N., Adachi K. et al. // In Vivo. – 2016. – Vol. 11-12, №30(6). – P. 777-785.

4. Hoekstra L.T. Physiological and biochemical basis of clinical liver function tests: a review / Hoekstra L.T., de Graaf W., Nibourg G.A. et al. // Ann. Surg. – 2013. – Vol. 257, №1. – P. 27-36.

5. Kim W.R. Serum activity of alanine aminotransferase (ALT) as an indicator of health and disease / Kim W.R., Flamm S.L., Di Bisceglie A.M., Bodenheimer H.C // Hepatology. – 2008. – Vol. 47, №4. – P. 1363-1370.

6. Kumar C.G. Physicochemical characterization and antioxidant activity of melanin from a novel strain of *Aspergillus bridgeri* ICTF-2011/ Kumar C.G., Mongolla P., Pombalanet S. et al. // Lett. Appl. Microbiol. – 2011. – Vol. 53, №3. – P. 350-358.

7. Kurian N.K. Evaluation of Anti-inflammatory property of Melanin from marine *Bacillus* sp BTCZ31/ Kurian N.K., Nair H.P., Bhat S.G. // Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. – 2015. – Vol. 8, Issue 3. – P. 251-255.

8. Lowry O.H. Protein measurement with Folin phenol reagent / Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randal R.I. // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol.193, №1. – P. 265-275.

9. Reitman S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases / Reitman S., Frankel S. // Am. J. Clin. Pathol. – 1957. – Vol.28, №1. – P. 56-63.

10. Sharma S. Antioxidant and hepatoprotective effect of polyphenols from apple pomace extract via apoptosis inhibition and Nrf2 activation in mice/ Sharma S., Rana S., Patil V. et al. // Human and Experimental Toxicology. – 2016. – Vol. 35. – P. 1264 – 1275.

11. Vernetti L.A. A human liver microphysiology platform for investigating physiology, drug safety, and disease models / Vernetti L.A., Senutovitch N., Boltz R. et al. // Experimental Biology and Medicine. – 2016. – Vol. 241. – P. 101-114.

12. Weng S.F. The value of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase in cardiovascular disease risk assessment / Weng S.F., Kai J., Guha I.N., Qureshi N. // Open Heart. – 2015. – Vol. 2. – P. e000272.

13. Ye M. Physicochemical characteristics and antioxidant activity of arginine-modified melanin from *Lachnum* YM-346 / Ye M., Wang Y., Guo G.Y., et al. // Food Chem. – 2012. – Vol. 135, №4. – P. 2490-2497.

Reference

1. Breinek P., Bouda J. Determination of urea using diacetylmonooxim without deproteinization in a sulfuric acid medium // Vnitr. Lek. – 1970. – Vol.16, №2. – P. 188-192.
2. Doumas B., Watson W., Biggs H. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green // Clin. Chim. Acta. – 1971. – Vol.31, №1. – P. 87-96.
3. Fukuchi K., Okudaira N., Adachi K. et al. Antiviral and antitumor activity of licorice root extracts // In Vivo. – 2016. – Vol. 11-12, №30(6). – P. 777-785.
4. Hoekstra L.T., de Graaf W., Nibourg G.A. et al. Physiological and biochemical basis of clinical liver function tests: a review // Ann. Surg. – 2013. – Vol. 257, №1. – P. 27-36.
5. Kim W.R., Flamm S.L., Di Bisceglie A.M., Bodenheimer H.C. Serum activity of alanine aminotransferase (ALT) as an indicator of health and disease // Hepatology. – 2008. – Vol. 47, №4. – P. 1363-1370.
6. Kumar C.G., Mongolla P., Pombalanetn S. et al. Physicochemical characterization and antioxidant activity of melanin from a novel strain of *Aspergillus bridgeri* ICTF-201 // Lett. Appl. Microbiol. – 2011. – Vol. 53, №3. – P. 350-358.
7. Kurian N.K., Nair H.P., Bhat S.G. Evaluation of Anti-inflammatory property of Melanin from marine *Bacillus* sp BTCZ31 // Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. – 2015. – Vol. 8, Issue 3. – P. 251-255.
8. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randal R.I. Protein measurement with Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol.193, №1. – P. 265-275.
9. Reitman S., Frankel S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases // Am. J. Clin. Pathol. – 1957. – Vol.28, №1. – P. 56-63.
10. Sharma S., Rana S., Patil V. et al. Antioxidant and hepatoprotective effect of polyphenols from apple pomace extract via apoptosis inhibition and Nrf2 activation in mice // Human and Experimental Toxicology. – 2016. – Vol. 35. – P. 1264 - 1275.
11. Verneti L.A., Senutovitch N., Boltz R. et al. A human liver microphysiology platform for investigating physiology, drug safety, and disease models // Experimental Biology and Medicine. – 2016. – Vol. 241. – P. 101-114.
12. Weng S.F., Kai J., Guha I.N., Qureshi N. The value of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase in cardiovascular disease risk assessment // Open Heart. – 2015. – Vol. 2. – P. e000272.
13. Ye M., Wang Y., Guo G.Y., et al. Physicochemical characteristics and antioxidant activity of arginine-modified melanin from *Lachnum YM-346* // Food Chem. – 2012. – Vol. 135, №4. – P. 2490-2497.

Надійшла до редколегії 23.11.16

Е. Дворченко, д-р биол. наук., А. Драницина, канд. биол. наук., Е. Торгалло, канд. биол. наук., А. Короткий, канд. биол. наук., Т. Береговая, д-р биол. наук.
Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко, Киев

ПОКАЗАТЕЛИ ПРОТЕИНОВОГО ОБМЕНА В КРОВИ КРЫС ПРИ ИЗУЧЕНИИ ХРОНИЧЕСКОЙ ТОКСИЧНОСТИ КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ МЕЛАНИНА

Исследовано хроническую токсичность композиции на основе меланина на показатели протеинового обмена в сыворотке крови крыс обоих полов. Установлено, что при действии меланина в терапевтической дозе 0,3 мг·кг⁻¹ в течение 90 дней в сыворотке крови самцов и самок крыс концентрация общего белка, альбумина, мочевины и активность аланинаминотрансферазы и аспаратаминотрансферазы остается в пределах контрольных значений. Показано, что при действии меланина в десятикратной терапевтической дозе 3 мг·кг⁻¹ в течение 90 дней в сыворотке крови самок активность аланинаминотрансферазы увеличивается в 1,36 раза, все остальные исследуемые показатели у самцов и самок находятся на контрольном уровне.

Ключевые слова: хроническая токсичность, меланин, протеиновый обмен.

K. Dvorshchenko, DSc., A. Dranitsina, PhD., Ie. Torgalo, PhD., A. Korotkiy, PhD., T. Beregova, DSc.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

INDICES OF PROTEIN METABOLISM IN BLOOD OF RATS IN THE STUDY OF CHRONIC TOXICITY BASED ON MELANIN

The chronic toxicity of the drug based on melanin was investigated on the basis of indices of protein metabolism in blood serum of rats of both sexes. It is found that by action of melanin in the therapeutic dose of 0.3 mg × kg⁻¹ during 90 days the concentration of total protein, albumin, urea, alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase remained within the control values in the serum of male and female rats. It was shown that by action of melanin in ten-fold therapeutic dose of 3 mg × kg⁻¹ for 90 days serum alanine aminotransferase was 1.36 times higher of the control value in females; at the same time all other analyzed parameters remained at the control level in both males and females.

Key words: chronic toxicity, melanin, protein metabolism.

УДК 576.31.577.151.6

А. Білюк, асп., А. Негеля, асп., Л. Гарманчук, д-р биол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ,
О. Скачкова, канд. биол. наук
Національний Інститут раку, Київ

АКТИВНІСТЬ ЦИТОХРОМОКСИДАЗИ ТА СУКЦИНАТДЕГІДРОГЕНАЗИ В ПЕРВИННІЙ КУЛЬТУРІ ПЕРЕЩЕПЛЮВАНОЇ КАРЦИНОМИ ЛЕГЕНЬ ЛЬЮЇС НА РІЗНИХ ЕТАПАХ РОСТУ ПУХЛИНИ

В клітинах первинної культури карциноми Льюїса активність цитохром оксидази на 14 добу росту первинної пухлини становила 2,4±0,15 мкмоль окисненого цит.с/мг·хв, на 25 добу даний показник знизився майже в 7 разів (p<0.01); активність сукцинатдегідрогенази на 25 добу знизилась до 21.7±2.3 мкмольK₃[Fe(CN)₆]/мг·хв., що у 1,6 разів менше, ніж сукцинатдегідрогеназна активність на 14 добу.

Ключові слова: цитохромоксидаза, сукцинатдегідрогеназа, карцинома легенів Льюїса, пухлина, рак, мітохондрія, окислювальний стрес, анеуплоїдія.

Вступ.

Найважливішими функціями мітохондрій є окиснення проміжних метаболітів вуглеводного, ліпідного та білкового обмінів, таких як піруват, жирні кислоти, ацетоацетат тощо, і використання енергії, що вивільнюється при розпаді цих сполук для біосинтезу АТФ. Інша важлива функція мітохондрій полягає у механізмах утворення апоптосом та запрограмованої смерті клітин [5, 9].

Мітохондріальні дисфункції, пов'язані з процесами окисного фосфорилування, структурною цілісністю мітохондрій та інформаційною ідентичністю їх генетичного апарату, виникають за умовоксидативного стресу, при хворобах, викликаних метаболічними порушеннями, а також канцерогенезі [5, 10]. Характерними ознаками трансформованих клітин є підвищення рівня активних форм кисню (АФК), неефективність транспорту електронів в дихальному ланцюзі, посилення метаболі-