

DOI: 10.26693/jmbs03.02.008

УДК 616.24-002-008.6-056.3-019-092:612.215.1.015.11]-085.274

Байда М. Л.

ЗМІНИ ВМІСТУ МАРКЕРІВ ПРООКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ ТА АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ В БРОНХАХ МОРСЬКИХ СВИНОК В ПІЗНІ ПЕРІОДИ РОЗВИТКУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АЛЕРГІЧНОГО АЛЬВЕОЛІТУ ТА ЇХ КОРЕКЦІЯ ТІОТРИАЗОЛІНОМ

Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького, Україна

bayda_m@ukr.net

У даній роботі проведено аналіз біохімічних досліджень стосовно рівня малонового діальдегіду і дієнових кон'югат, за якими охарактеризовано функціональний стан процесів ліпопероксидації, та захисної спроможності каталази в бронхах морських свинок у пізні доби (44-у і 54-у) формування екзогенного алергічного альвеоліту. З'ясовано, що до початку терапії тіотриазоліном спостерігається підвищення вмісту як малонового діальдегіду так і дієнових кон'югат, з одночасним зниженням активності каталази в бронхіальній тканині піддослідних тварин. При лікуванні даним засобом в досліджуваному об'єкті відмічається зниження вмісту малонового діальдегіду і дієнових кон'югат, та підвищення активності каталази, як одного із ключових маркерів антиоксидантного захисту клітин організму.

Ключові слова: екзогенний алергічний альвеоліт, бронхи, алергія, запалення, перекисне окиснення ліпідів, каталаза, тіотриазолін.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Стаття є фрагментом комплексної науково-дослідної роботи кафедри патологічної фізіології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького «Патофізіологічні механізми розвитку алергічних і запальних процесів на різних рівнях організації, особливості реактивності організму та їх фармакологічна корекція», № державної реєстрації 0106U012669. Автор є співвиконавцем теми.

Вступ. На сьогодні екзогенний алергічний альвеоліт (ЕАА) розглядається як імунно-запальне

захворювання легень, яке характеризується дифузним ураженням альвеол та термінальних бронхіол і проявляється у вигляді дифузно-розсіяних альвеолітів, що значно утруднює вчасне діагностування цієї нозології лікарями-практиками [1, 3, 10]. У зв'язку з тим, в таких хворих виникають різноманітні ускладнення у вигляді хронічної дихальної недостатності, легеневого серця чи пневмосклерозу [11, 13, 17].

Проте слід зазначити, що проблема ЕАА сьогодні зберігає свою актуальність ще і тому, що більшість принципів питань патогенезу та лікування цього захворювання залишаються суперечливими [7].

Однією з визначальних ланок в патогенезі цієї недуги є дисбаланс систем перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) та антиоксидантного захисту (АОЗ) що і зумовлює виражені зміни у бронхо-легеневому комплексі [6, 9, 16].

Тому проблема корекції даних порушень препаратами, що володіють вираженою антиоксидантною спроможністю, є актуальною і відповідає запиту на лікування легневих захворювань алергічного генезу. Одним з такої групи препаратів є тіотриазолін, як препарат, який, проявляючи регуляторний вплив на всі види обміну речовин в організмі, має дезінтоксикаційні, антиоксидантні, мембраностабілізуючі, імуномодулюючі властивості та сприяє процесам репарації тканин [4, 12, 15].

Мета дослідження – встановити роль оксидантного стресу в патогенезі експериментального алергічного альвеоліту та корегуючий вплив

тіотриазоліну на змінені показники про- та антиоксидантної систем.

Матеріал та методи дослідження. Експериментальні дослідження проведені на 30 морських свинках-самцях масою 180–230 г. Викликали експериментальний ЕАА шляхом введення 0,2 мл повного ад'юванта Фрейнда в задню лапку морської свинки. Через 2 тижні після імунізації 5 разів з інтервалом 10 діб внутрішньовенно вводили 0,2 мл 1%-го розчину БЦЖ в ізотонічному розчині NaCl (бацिला Кальмета-Герена) [8]. В подальших дослідженнях застосовували 1% суспензію вбитих БЦЖ в ізотонічному розчині натрію хлориду як антиген на 24-у, 34-у, 44-у, 54-у доби експерименту.

Декапітацію тварин здійснювали на 44-у і 54-у доби після введення антигену під ефірним наркозом. У тварин забирали шматочки бронхів шляхом висічення через 1–2 хв. після забою тварин. Упродовж 5–6 хв. їх зберігали на льоді, а згодом обезкровлювали багаторазовою перфузією охолодженим ізотонічним розчином натрію хлориду за допомогою голки і шприца і подрібнювали ножицями.

Подрібнену тканину зважували і поміщали у скляний гомогенізатор з тефлоновим товчачиком (МРТУ-42 1505-63). Склянку гомогенізатора поміщали у мішечок зі шматочками льоду під час гомогенізації для попередження нагрівання. Здійснювали гомогенізацію тканини впродовж 30–50 с., роблячи декілька рухів склянкою вверх і вниз; швидкість обертання товчачика 800 – 900 об./хв. Середовищем для гомогенізації був охолоджений 5 мМ трис-НСІ буфер, рН 7,4, кінцеве розведення гомогенату становило 1:9.

Одержаний тканинний гомогенат фільтрували через два шари марлі у пробірки для центрифугування. Для одержання щільної фракції і видалення не повністю зруйнованих клітин та ядер гомогенат центрифугували 10 хв. при 3000 г ($t = 0 \pm 2$). Використовували надосадову рідину під час досліджень.

Вміст МДА визначали – методом Коробейникова [5], а ДК- методом – Гаврилова-Мишкорудної [2]. Активність КТ визначали методом Holmes R., Masters C. [14].

Нами був застосований препарат тіотриазолін у дозі 100 мг/кг, який вводили внутрішньом'язово один раз на добу впродовж 10 днів (з 44-ої по 54-у доби).

Досліди на морських свинках виконували з дотриманням ухвали Першого національного конгресу з біоетики про захист хребетних тварин, які використовуються для наукових цілей (Київ, 2001), що підтверджено заключенням комісії з біоетики Львівського національного медичного університету ім. Данила Га-

лицького (протокол № 2 від 21 лютого 2011 р.). Статистичне опрацювання результатів дослідження здійснювалося за допомогою програми Microsoft Excel. Обчислення основних статистичних показників проводили за безпосередніми кількісними даними, отриманими в результаті досліджень (середнє арифметичне значення – M ; стандартна похибка середнього арифметичного – m). Для оцінки вірогідності різниці між статистичними характеристиками двох альтернативних сукупностей даних обчислювали коефіцієнт Стьюдента. Вірогідно вважали різницю при показах вірогідності $p \geq 0,95$ (рівень значимості $p < 0,05$), знайдену після обчислення t за таблицею t – розподілу Стьюдента.

Статистичну обробку результатів досліджень проводили на ПЕОМ Pentium 233 з використанням стандартних алгоритмів та програм для їх реалізації і критерію Стьюдента t та кореляційного аналізу.

Прилади, що використовувалися для наукових досліджень, підлягали метрологічному контролю.

Результати дослідження та їх обговорення.

Дані експериментальних досліджень показали, що в пізньому періоді розвитку (44-а доба) ЕАА спостерігається підвищення вмісту ДК в бронхах на 104,55% ($p < 0,05$) з досягненням його найвищого рівня зростання – на 169,55% ($p < 0,05$) у найтриваліший термін (54-а доба) експерименту відносно групи інтактних морських свинок. Аналогічний напрям змін спостерігаємо і стосовно вмісту МДА в бронхах тварин на 44-у та 54-у доби формування ЕАА – підвищення вмісту МДА на 80,16% ($p < 0,05$) і 87,04% ($p < 0,05$) проти показників контролю, що свідчило про активізацію процесів перекисного окиснення ліпідів. Активні форми кисню активують пошкодження клітинних структур, призводять до загибелі клітин та активації проліферації фібробластів, що призводить до прогресування патологічного процесу.

Інтенсифікація процесів ПОЛ призвела і до змін у ферментативній ланці АОЗ. Так, захисна спроможність КТ у бронхах на 44-у і 54-у доби фор-

Таблиця 1 – Вплив тіотриазоліну на вміст ДК та МДА у бронхах морських свинок при ЕАА ($M \pm m, n = 30$)

Форма досліджу		Кількість тварин	ДК в нмоль/г	МДА в нмоль/г
Інтактні тварини. Контроль		10	11,20 ± 0,60	18,60 ± 0,80
Морські свинки з експериментальним ЕАА	до лікування	10	30,19 ± 0,36 $p < 0,05$	34,79 ± 0,50 $p < 0,05$
	після лікування тіотриазоліном	10	16,49 ± 0,24 $p < 0,05$ $p_1 < 0,05$	22,28 ± 0,33 $p < 0,05$ $p_1 < 0,05$

Примітки: p – достовірність різниці показників при ЕАА до лікування в порівнянні з даними у контрольній групі; p_1 – достовірність різниці показників при ЕАА (до лікування) в порівнянні з даними альвеоліту (після лікування) тіотриазоліном.

Таблиця 2 – Вплив тіотриазоліну на активність КТ у бронхах морських свинок при ЕАА ($M \pm m$, $n = 30$)

Форма досліджу		Кількість тварин	КТ в м.о./г
Інтактні тварини. Контроль		10	42,70 ± 3,40
Морські свинки з експериментальним ЕАА	до лікування	10	27,69 ± 0,40 $p < 0,05$
	після лікування тіотриазоліном	10	39,99 ± 0,48 $p > 0,05$ $p_1 < 0,05$

Примітки: p – достовірність різниці показників при ЕАА до лікування в порівнянні з даними у контрольній групі; p_1 – достовірність різниці показників при ЕАА (до лікування) в порівнянні з даними альвеоліту (після лікування) тіотриазоліном.

мування ЕАА характеризується зниженням активності даного ферменту відповідно на 24,33% ($p < 0,05$) і 35,15% ($p < 0,05$) проти величин групи контролю. Одержані результати дають можливість висловити думку про те, що в пізні доби розвитку цієї патології, внаслідок гіперпродукції вільних радикалів, відбувається депресія антиоксидантної спроможності, що призводить до дисбалансу в системі ПОЛ/АОС та до розвитку оксидантного стресу.

Застосування тіотриазоліну призвело до зниження вмісту ДК на 45,37% ($p < 0,05$) і на 35,95% ($p < 0,05$) – МДА, в досліджуваних об'єктах, проти групи морських свинок, які не отримували цього лікарського препарату, що є свідченням його вираженого терапевтичного ефекту (табл. 1).

Зміни після застосування даного засобу також спостерігаються і в ферментативній системі АОЗ, а саме – зростає активність КТ у бронхах на 44,42%

($p < 0,05$) проти групи тварин з ЕАА, яким не вводили цей антиоксидант, що свідчить про його позитивний вплив на перебіг ЕАА (табл. 2).

Отже, застосування тіотриазоліну в терапії даної патології, на нашу думку, є патогенетично обґрунтованим і доцільним, оскільки спостерігається його виражений терапевтичний ефект – гальмівна дія на дані маркери ліпопероксидації шляхом зв'язування їх гіперактивованого потенціалу. Результати є експериментальним обґрунтуванням можливості застосування тіотриазоліну в терапії ЕАА.

Висновки

1. Експериментальний алергічний альвеоліт на 44-у і 54-у доби формування характеризується вираженою інтенсифікацією накопичення продуктів ліпопероксидації – ДК і МДА – в бронхах морських свинок, з паралельним зниженням ферментативної активності КТ, що свідчить не лише про посилення синтезу продуктів ПОЛ, але й поступову депресію ферментативної ланки антиоксидантного захисту в умовах окислювального стресу.
2. Застосування тіотриазоліну в динаміці формування ЕАА призвело до зниження рівня ДК і МДА та підвищення активності КТ в тканинах бронхів, що є свідченням його компенсаторного ефекту завдяки окислювально-відновним властивостям молекул тіольної групи, що входять у склад препарату.

Перспективи подальших досліджень. У подальшому планується дослідження додаткових показників перекисного окиснення ліпідів та активності АОС в легенях морських свинок за умов розвитку експериментального алергічного альвеоліту та їх фармакологічна корекція.

References

1. Rebrov AP, Ponomareva YeYu, Chesnokova YeV. Idiopaticheskii fibroziruyushchii al'veolit v praktike terapevta. *Klinicheskaya meditsina*. 2002; 9: 63-5. [Russian].
2. Gavrilov VB, Mishkorudnaya MI. Spektrofotometricheskoye opredeleniye sodержaniya gidroperekisey lipidov v plazme krovi. *Laboratornaya diagnostika ishemicheskoy bolezni serdtsa*. K: Zdorov'ye, 1989. s 170-1. [Russian].
3. Dzyublyk OYa, Zaykov SV, Hryshylo PV. Ekzohennyi alerhichnyy alveolit. *Klinichna imunohiyya. Alerhohiyya. Infektolohiyya*. 2010; 3 (32): 17-21. [Ukrainian].
4. Ilyuk IA. Klinichna efektyvnist likuvannya khvorykh na nehospitalnu pnevmoniyu iz vykorystannyam tiotriazolinu. *Ukrayinskyy pulmonologichnyy zhurnal*. 2014; 4: 69-71. [Ukrainian].
5. Korobeynikova EN. Modifikatsiya opredeleniya produktov POL v reaksii s tiobarbiturovoy kislotoy. *Lab delo*. 1989; 7: 8-10. [Russian].
6. Lushchak VI, Bahnyukova TV, Luzhna LI. Pokaznyky oksydatyvnoho stresu. Peroksydy lipidiv: metody. *Ukr biokhim zhurnal*. 2006; 6: 113-20 [Ukrainian].
7. Il'kovich MM, Novikova LN, Koroleva MG. Idiopaticheskii fibroziruyushchii al'veolit: protivorechiya v sovremennykh predstavleniyakh. *Pul'monologiya*. 2003; 3: 98–101. [Russian].
8. Orekhov OO, Kirillov YuA. Patomorfologiya legkikh i mikrotsirkulyatornogo rusla malogo kruga krovoobrashcheniya pri khronicheskom eksperimental'nom allergicheskom al'veolite. *Arkhiv patologii*. 1985; 10: 54-61. [Russian].
9. Popova LD, Shcherban' MH, Vasylyeva IM. Aktyvnist' fermentiv antyoksydantnoho zakhystu v krovi shchuriv pry hostromu lokal'nomu zapalenni. *Odes'kyi medychnyy zhurnal*. 2010; 6 (122): 6-7. [Ukrainian].
10. Reheda MS, Hrytsko RYu. *Ekzohennyi alerhichnyy alveolit: monohrafiya*. Vyd 2-e, dop ta pererob. Lviv: Spolom, 2007. 200 s [Ukrainian].
11. Reheda MS. *Alerhichni zakhvoryuvannya leheniv. Monohrafiya*. Lviv, 2009. 342 s. [Ukrainian].
12. Vizir AD, Vizir VA, Dunayev VV, i dr. Tiotriazolin – sozdaniye, mekhanizm deystviya, dostizheniya i perspektivy primeneniya v meditsine. *Aktual'ni pitannya farmatsevtichnoi ta medichnoi nauki ta praktiki*. 2002; 8: 3–11. [Russian].
13. Yuksel M, Ozyurtkan MO, Bostanci K, Ahiskali R, Kodalli N. Acute exacerbation of interstitial fibrosis after pulmonary resection. *Ann Thorac Surg*. 2006; 82: 336-8. PMID: 16798250. DOI: 10.1016/j.athoracsur.2005.09.036.

14. Holmes R, Masters C. Epigenetic interconversions of the multiple forms of mouse liver catalase. *FEBS Lett.* 1970; 11 (1): 45-8. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(70\)80488-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(70)80488-4).
15. Lee W. Jennifer Future applications of antioxidants in premature infants. *Curr Opin Pediatr Author manuscript.* 2011; 23 (2): 161-6. <https://doi.org/10.1097/MOP.0b013e3283423e51>.
16. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *WAO J.* 2012; 5: 9-19. PMID: 23268465. PMCID: PMC3488923. DOI: 10.1097/WOX.0b013e3182439613
17. Thabut G, Fournier M, Collard HR, et al. Prognosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004; 169 (9): 1075–6. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.169.9.962>.

УДК 616.24-002-008.6-056.3-019-092:612.215.1.015.11]-085.274

ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ МАРКЕРОВ ПРООКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ И АНТИОКСИДАТНОЙ ЗАЩИТЫ В БРОНХАХ МОРСКИХ СВИНОК В ПОЗДНИЙ ПЕРИОД РАЗВИТИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АЛЛЕРГИЧЕСКОГО АЛЬВЕОЛИТА И ИХ КОРРЕКЦИЯ ТИОТРИАЗОЛИНОМ

Байда М. Л.

Резюме. В данной работе проведен анализ биохимических исследований относительно уровня малонового диальдегида и диеновых конъюгат, по которым охарактеризованы функциональное состояние процессов липопероксидации, и защитной способности каталазы в бронхах морских свинок, в поздние сутки (44е и 54е) формирования экзогенного аллергического альвеолита. Установлено, что до начала терапии тиотриазолином наблюдается повышение содержания как малонового диальдегида, так и диеновых конъюгат, с одновременным снижением активности каталазы в бронхиальной ткани подопытных животных. При использовании тиотриазолина, в исследуемом объекте отмечается снижение содержания малонового диальдегида и диеновых конъюгат, и повышение активности каталазы, как одного из ключевых маркеров антиоксидантной защиты клеток организма.

Ключевые слова: экзогенный аллергический альвеолит, бронхи, аллергия, воспаление, перекисное окисление липидов, каталаза, тиотриазолин.

UDC 616.24-002-008.6-056.3-019-092:612.215.1.015.11]-085.274

Pro-Oxidant and Antioxidant Markers` Change in Guinea Pigs` Bronchi in the Late Periods of Experimental Allergic Alveolitis Development and their Correction with Thiotriazolin

Baida M. L.

Abstract. Our findings indicate significant accumulation of lipid peroxidation products in the animal bronchi and insufficient capacity of antioxidant defense during experimental allergic alveolitis, and corrective effect of antioxidant-thiotriazolin on these indicators. A potential role of oxidative stress in the pathogenesis of allergic alveolitis has been demonstrated. Increased oxidant levels and decreased antioxidant defenses can contribute to the progression of these diffuse lung diseases.

Materials and methods. We analyzed the results of research conducted on conjugated diene and malondialdehyde content and catalase activity systems in guinea pigs bronchi in the dynamic of experimental allergic alveolitis (EAA). The investigation involved 40 female guinea pigs weighing 180–220 g. EAA was induced by the method of O. O. Orehov and Y. A. Kyrylov. Prior, the animals had been immunized with Freund's *complete* adjuvant (0.2 ml intramuscularly into a hind leg). In 2 weeks, 0.2 ml of 1% BCG solution was introduced intravenously every 10th day. Later, the animals were decapitated; the level of lipoperoxidational processes and activity of antioxidant system enzymes were detected in bronchi homogenate on the 44th and 54th days after EAA. The content of conjugated dienes was determined by the method of V.B. Havrylov and M. I. Myshkorudina, malondialdehyde – by E.N. Korobeinikov method, catalase activity – by R. Holmes. Thiotriazolin was used for 10 days (from 44th to 54th days) intramuscularly at a dose of 100 mg/kg. All digital results were statistically processed using arithmetic mean (M), margin of error of arithmetic mean (m), and Student's criterion «t». The calculations were performed using means of statistical and graphic analysis of electron tables Microsoft Excel (Microsoft office programs). Statistically reliable were the results with P ≤ 0.05.

Results and discussion. The results of experimental work showed that the content of conjugated diene and malonic dialdehyde level in animals' bronchial tissue rose proportionally to the day of experiment in the late periods of EAA development as compared with the control group, indicating activation of these markers. Antioxidant system capacity to defend against free radical accumulation was suppressed. Catalase activity in the late period of this immune complex pathology was decreased.

Antioxidant thiotriazolin had corrective effect on changing indicators as pro- and antioxidant systems. It has regulatory effect on all metabolic processes in the body, has antioxidant properties, makes membranes more stable, and contributes to healing processes. There was a reduction of conjugated diene and malondialdehyde content in bronchi and elevation of catalase activity in the group of guinea pigs which did not reserve this drug.

Keywords: experimental allergic alveolitis, peroxide lipid oxidation, antioxidant system, bronchi, catalase, thiotriazolin.

Стаття надійшла 18.01.2018 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування