© Алексевич К. О., Фіра Л. С., Лихацький П. Г., Рицик О. Б.

УДК 616/. 12-025. 1-015. 1-05:612. 015. 31]-092. 6

Алексевич К. О., Фіра Л. С., Лихацький П. Г., Рицик О. Б.

АКТИВНІСТЬ МАРКЕРНИХ ФЕРМЕНТІВ МІОКАРДУ У ЩУРІВ ЗА УМОВ УРАЖЕННЯ ТОКСИЧНИМИ ДОЗАМИ АДРЕНАЛІНУ

Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського

(м. Тернопіль)

Дана робота є фрагментом планової наукової теми кафедри медичної біохімії та фармакології Тернопільського державного медичного університету ім. І. Я. Горбачевського «Біохімічні механізми токсичності нано-частинок різної природи та інших антропогенних та біогенних токсикантів в біологічних системах», № держ. реєстрації 0112U000542.

Вступ. В даний час не втрачає актуальності проблема профілактики, діагностики та лікування серцево-судинних захворювань через їх значну поширеність і серйозні наслідки. У зв'язку із високою соціально-економічною значимістю даних захворювань, видається актуальним впровадження нових методів ранньої діагностики, медикаментозної корекції та оцінки прогнозу у цієї категорії хворих [9].

Протягом останніх років в медицині інтенсивно розвивається так званий «метаболічний» напрямок, що ставить за свою мету теоретичний і прикладний аналіз обмінних процесів на різних рівнях, як основу або фон для багатьох захворювань. Як відомо, пусковим механізмом для метаболічних змін при серцево-судинних захворюваннях є різного роду стресогенні фактори, які ініціюють підвищення рівня ендогенних катехоламінів в організмі [1, 12].

В умовах гіперкатехоламінемії, перш за все, порушується регуляція активності ключових ферментів метаболізму вуглеводів і жирних кислот, які контролюють транспорт і швидкість окислення енергетичних субстратів в мітохондріях кардіоміоцитів. Адреналін у високих концентраціях сприяє порушенню кровопостачання, провокує метаболічний дисбаланс, зокрема активує систему перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), викликає появу активних форм кисню, збільшує накопичення іонів кальцію та ін. [2, 3, 5].

Відомо, що прогноз при гострій серцевій патології базується на динаміці біохімічних маркерів. Саме тому інтенсивно досліджується динаміка метаболічних процесів та кореляція біохімічних показників за умови вищезгаданих патологічних станів [15, 17].

Метою даного **дослідження** було вивчення динаміки активності маркерних ферментів міокарду та їх взаємозв'язок із показниками вільнорадикального окиснення в процесі розвитку гострого ураження міокарду підвищеними дозами адреналіну.

Об'єкт і методи дослідження. Експерименти виконано на 50-ти нелінійних білих щурах-самцях масою 180-200 г, які утримувалися на стандартному раціоні віварію Тернопільського державного медичного університету імені І. Я. Горбачевського.

Гостре адреналінове пошкодження міокарда спричиняли шляхом одноразового внутрішньом'язового уведення 0,18% розчину адреналіну гідротартрату ("Дарниця", Україна) в дозі 0,5 мг/кг [12]. Евтаназію проводили з використанням тіопенталу натрію на 3-тю, 24-ту і 48-му годину після його введення. Кров забирали із серця тварин. Дослідженням піддавали гомогенат серця та сироватку крові дослідних та контрольних тварин (інтактні).

У вищевказаних тканинах визначали вміст ТБК-активних (ТБК-АП) продуктів [11, 13]. Інтенсивність окислювальної модифікації білків визначали по методу R. Levine шляхом реєстрації оптичної щільності аліфатичних альдегідо- та кетодинітрофенілгідразонів основного і нейтрального характеру (2,4-ДНФГ) [14, 16]. Активність креатинфосфокінази (КФК) [7] та лактатдегідрогенази (ЛДГ) [8] у зразках вивчали кінетичним методом, активність амінотрансфераз в реакції з 2,4-динітрофенілгідразином [13].

Всі експерименти виконано із дотриманням загальних правил і положень Європейської Конвенції із захисту хребетних тварин, які використовуються для дослідницьких та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), Загальних етичних принципів експериментів на тваринах (Київ,2001) [6].

Статистичну обробку результатів дослідження здійснювали за допомогою методів варіаційної статистики з використанням критерію Ст'юдента [10].

Результати досліджень та їх обговорення. У сироватці крові та міокарді щурів після ураження токсичними дозами адреналіну нами вивчено вміст ТБК-АП продуктів, які є одними із кінцевих продуктів процесу ліпопероксидації. Як показали результати проведених досліджень, після ураження тварин адреналіном у сироватці крові та міокарді різко зростав їх вміст. На 3-тю годину від початку експерименту вміст ТБК-АП продуктів збільшувався у

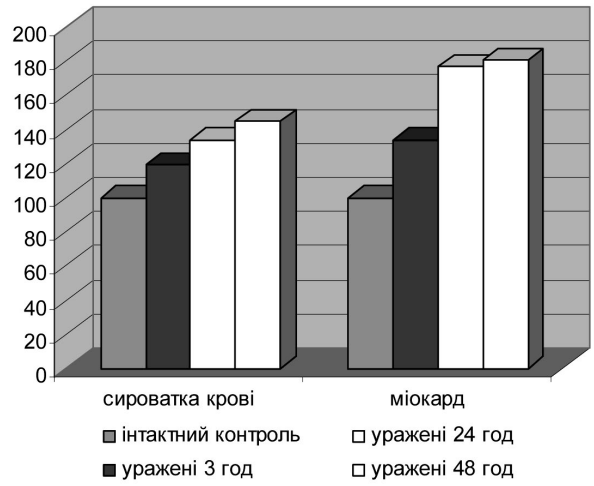

Рис. 1. Динаміка вмісту ТБК- активних продуктів у міокарді та сироватці крові щурів, уражених токсичними дозами адреналіну, %.

порівнянні з контролем на 19,2 % у сироватці крові і на 32,1 % у міокарді (**рис. 1**).

В подальшому величина даного показника зростала і була більшою у порівнянні із контролем на 24-ту годину на 34 % у сироватці крові і на 76 % у міокарді, на 48-му годину – на 45,4 % і 81,3 % відповідно.

Відомо, що раннім індикатором пошкодження клітин за умов вільно радикального окислення є окисна модифікація білків (ОМБ). Вважають, що ОМБ відіграє ключову роль у молекулярних механізмах оксидативного стресу і є пусковим механізмом до окислювальної деструкції інших молекул, наприклад, ліпідів і нуклеїнових кислот.

При дослідженні процесів окисної модифікації білків в організмі щурів нами встановлено, що під дією адреналіну вміст альдегідо- і кетопохідних нейтрального характеру (ОМБ370) в терміні 3 год зростав у порівнянні з інтактною групою у 1,7 раза в сироватці крові і в 1,4 раза в міокарді (**табл. 1**).

В подальшому їх вміст збільшувався і в терміні 24 год був більшим у порівнянні з контролем у 2,2 раза в сироватці крові і в 1,6 раза у міокарді, в терміні 48 год – у 2,6 і 1,9 раза відповідно. Щодо альдегідо- і кетопохідних основного характеру (ОМБ430), їх вміст зростав аналогічно із попереднім показником в 2,25 раза в сироватці крові і в 1,4 раза у міокарді в терміні 3 год, і відповідно в 5,3 і 1,2 раза в терміні 24 год, а також в 5,9 і 1,4 раза в терміні 48 год.

Паралельно, для співставлення активності вільнорадикальних процесів та цитолітичних процесів, нами було проведено визначення активності ферментів цитолізу – креатинфосфокінази і лактатдегідрогенази в сироватці та міокарді уражених та інтактних тварин.

У всі терміни дослідження відмічалося зростання активності ЛДГ у сироватці крові (**табл. 2**) після ураження міокарду адреналіном. Даний показник збільшився у порівнянні з контролем на 116 % на 3-тій годині, на 138 % на 24-тій годині і на 269 % на 48-мій годині після введення кардіотоксину.

Щодо активності даного ферменту у гомогенаті міокарду, то його величина зменшувалась.

Так, на 3-тій годині дослідження даний показник менший у порівнянні з тваринами інтактного контролю на 28 %, через 24 і 48 годин після введення адреналіну він збільшується на 4 % і 6 %, відповідно, у порівнянні із попереднім терміном, проте рівня контролю не досягає.

При дослідженні активності креатинфосфокінази виявлено її збільшення у сироватці крові через 3 години після ураження у порівнянні з контролем у 2,5 раза (**рис. 2**).

Найбільшого значення даний показник набуває у терміні 24 години після ураження і є більшим від контролю у 2,7 раза, вже на 48 годині дослідження він зменшується, проте залишається більшим від контролю в 2,3 раза. Паралельно проводилося дослідження активності даного ферменту в міокарді, де відмічається обернений процес – зниження у 2 рази на 3 години та в 2,7 раза на 24 годині дослідження,

Таблиця 1

Вміст 2,4-ДНФГ$_{(370)}$ та 2,4-ДНФГ$_{(430)}$ у сироватці крові та міокарді (ммоль /г білка) щурів, уражених адреналіном

Групи тварин	Інтактний контроль	Уражені адреналіном, 3 год	Уражені адреналіном, 24 год	Уражені адреналіном, 48 год
	2,4-ДНФГ$_{(370)}$			
Сироватка крові	0,043 ± 0,0016	0,073 ± 0,0025*	0,093 ± 0,0020*	0,112 ± 0,0037*
Міокард	0,052 ± 0,0021	0,074 ± 0,0016*	0,082 ± 0,0023*	0,098 ± 0,0027*
	2,4-ДНФГ$_{(430)}$			
Сироватка крові	0,016 ± 0,0010	0,036 ± 0,0009*	0,084 ± 0,0015*	0,094 ± 0,0012*
Міокард	0,049 ± 0,0024	0,067 ± 0,0017*	0,061 ± 0,0027	0,070 ± 0,023

Примітка: * – вірогідні зміни між тваринами інтактного контролю та ураженими адреналіном.

Таблиця 2

Активність ЛДГ у сироватці крові (Мод/л) та міокарді (Мод/100 г) у щурів, уражених адреналіном

Групи тварин	Інтактний контроль	Уражені адреналіном, 3 год	Уражені адреналіном, 24 год	Уражені адреналіном, 48 год
Сироватка крові	156,65 ± 14,90	390,39 ± 17,23	413,21 ± 18,76	639,34 ± 6,33
Міокард	123,44 ± 2,74	89,35 ± 1,85	92,77 ± 2,40	94,65 ± 2,39

Примітка: * – вірогідні зміни між тваринами інтактного контролю та ураженими адреналіном.

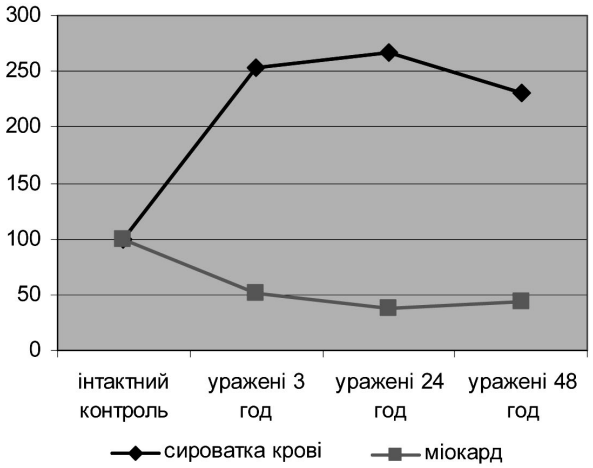

Рис. 2. Динаміка активності КФК в сироватці крові і міокарді щурів, уражених адреналіном, в різні терміни ураження, %.

Таблиця 3

Активність АсАТ та АлАТ у сироватці крові (мкмоль/л год) та міокарді (мкмоль/кг год) у щурів, уражених адреналіном

Групи тварин	Сироватка крові		
	АлАТ	АсАТ	Коефіцієнт де Рітіса
Інтактний контроль	1,99 ± 0,18	2,41 ± 0,11	1,21
Уражені адреналіном, 3 год	2,35 ± 0,24	2,73 ± 0,08	1,17
Уражені адреналіном, 24 год	2,45 ± 0,03	3,25 ± 0,09*	1,33
Уражені адреналіном, 48 год	2,79 ± 0,07*	3,85 ± 0,14*	1,38

на 48 годині даний показник нижчий від контролю у 2,3 раза.

Така динаміка активності досліджуваних ферментів підтверджує посилення мембранодеструктивних процесів із виходом даних внутрішньоклітинних ензимних білків у кров.

Збільшення активності АсАТ у сироватці крові є прогностичним тестом на інфаркт міокарду, а також прямим підтвердженням цитолізу кардіоцитів в умовах ураження міокарду.

Відомо, що при інфаркті міокарду активність АсАТ може зрости в 8-10 разів, активність АлАТ – в 1,5- 2 раза. Враховуючи органоспецифічність даних ензимів доцільно була врахувати коефіцієнт де Рітіса, який показує місце локалізації токсичного процесу (**табл. 3**).

Нами встановлено, що через 3 год після ураження адреналіном коефіцієнт де Рітіса практично залишається на рівні інтактного контролю, навіть дещо нижче нього. Починаючи з 24 год експерименту коефіцієнт збільшується і досягає максимуму через 48 год від початку ураження. Це свідчить про те, що саме у ці терміни починає розвиватись ішемія міокарду, що зумовлює цитоліз кардіоцитів.

Висновки. В експерименті на щурах встановлено, що ураження міокарду адреналіном в дозі 0,5 мг/кг маси тіла призводить до активації процесів ліпопероксидації та окиснювальної модифікації білків, максимум чого приходиться на 48 годину від початку дослідження. Нагромадження токсичних продуктів вільнорадикальних реакцій супроводжується цитолізом кардіоцитів, що зумовлює вихід органоспецифічних ферментів у кров. Відмічається підвищення активностей креатинфосфокінази, аспартатамінотрансферази та лактатдегідрогенази у сироватці крові уражених тварин та зниження їх у міокарді.

Перспективи подальших досліджень. Проведені дослідження поглиблюють уявлення про патогенез розвитку адреналінового пошкодження міокарду та дозволяють запропонувати за даних умов використання препаратів з мембраностабілізуючими та антиоксидантними властивостями, що і буде метою подальших наших досліджень. Передбачається використання кардіопротекторів рослинного походження.

Література

1. Барабаш Л. С. Клиническая значимость показателей эндотелиальной дисфункции, оксидативного стресса и гемостаза у больных инфарктом миокарда / Л. С. Барбараш, В. В. Кашталап, В. Н. Каретникова [та ін.] // Патол. кровообращения и кардиохирургия. – 2007. – № 2. – С. 28-33.
2. Бизенкова М. Н. О роли активации процессов липопероксидации в механизмах ишемического повреждения миокарда / М. Н. Бизенкова, Н. П. Чеснокова, М. Г. Романцов // Современные наукоемкие технологии. – 2006. – № 2 – С. 26-31.
3. Воронцова Н. Л. Свободнорадикальное окисление и миокард / Н. Л. Воронцова, С. А. Бернс, О. Л. Барабаш. – М.: Кемерово, 2006. – 159 с.
4. Губский Ю. И. Токсикологические последствия окислительной модификации белков при различных патологических состояниях // Современные проблемы токсикологии. – 2005. – Т. 8, № 3 – С. 20–27.
5. Гулага О. І. Процеси ліпопероксидації у хворих на серцеву недостатність / О. І. Гулага, В. К. Тащук, О. С. Полянська // Буковинський медичний вісник. – 2010. – Т. 14, № 2(54). – С. 122-124.
6. Использование лабораторных животных в токсикологическом эксперименте (методические рекомендации); под редакцией проф., академика РАМН П. И. Сидорова. – Архангельск. – 2002. – 84 с.
7. Інструкція з використання набору реагентів для визначення загальної активності креатинкінази в сироватці , плазмі крові Креатинкіназа-кін. »СпЛ». – Погоджено Моз України. – 2009.
8. Інструкція до набору реактивів для визначення загальної активності лактатдегідрогенази (ЛДГ) (кінетичний УФ метод). – 2011.
9. Кушаковский М. С. Метаболические болезни сердца / М. С. Кушаковский. – СПб.: Фолиант, 2000. – 128 с.

10. Лапач С. Н. Статистические методы в медикобиологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. – К : Морион, 2000. – 320 с.
11. Лущак В. І. Показники оксидативного стресу. Тіобарбітуративні продукти і карбонільні групи білків / В. І. Лущак, Т. В. Багнюкова, О. В. Лущак //Укр. біохім. журн. – 2004. – Т. 26. – С. 136-141.
12. Маркова О. О. Міокардіодистрофія і реактивність організму. –Тернопіль : Укрмедкнига, 1998. – 150 с.
13. Меньшиков В. В. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / В. В. Меньшиков, Л. Н. Делекторская, Р. П. Золотницкая [и др.]; [под ред. В. В. Меньшикова]. – М.: Медицина, 1987. – С. 122, 179-180.
14. Муравьева Л. Е. Окислительная модификация белков: проблемы и перспективы исследования / Л. Е. Муравьева // Фундаментальные исследования. – 2010. – № 1. – С. 74–78.
15. Трифонов, И. Р. Биохимические маркеры некроза миокарда. Общая характеристика биомаркеров, их применение для диагностики инфаркта иокарда: обзор современных рекомендаций / И. Р. Трифонов // Кардиология. – 2001. – № 11. – С. 93–95.
16. Dalle-Donne I. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress / I. // Dalle-Donne Clinica Chimica Acta. – 2003. – № 329. – P. 23–38.
17. Bhayana V. Biochemical Markers of Myocardial Damage / V. Bhayana, R. Henderson // Clin. Biochem. – 1995. – Vol. 28, № 1. – P. 1-29.

УДК 616/. 12-025. 1-015. 1-05:612. 015. 31]-092. 6

АКТИВНІСТЬ МАРКЕРНИХ ФЕРМЕНТІВ МІОКАРДУ У ЩУРІВ ЗА УМОВ УРАЖЕННЯ ТОКСИЧНИМИ ДОЗАМИ АДРЕНАЛІНУ

Алексевич К. О., Фіра Л. С., Лихацький П. Г., Рицик О. Б.

Резюме. Встановлено, що за умов ураження міокарду щурів адреналіном в дозі 0,5 мг/кг маси тіла активуються процеси ліпопероксидації, які досягають максимуму через 48 год від початку експерименту. Паралельно відмічено інтенсифікацію процесів окислювальної модифікації білків та цитолізу плазматичних мембран кардіоцитів, на що вказує підвищення активності маркерних ферментів міокарду креатинфосфокінази та лактатдегідрогенази.

Ключові слова: адреналін, міокард, ліпопероксидація, окислювальна модифікація білків, лактатдегідрогеназа, креатинфосфокіназа.

УДК 616/. 12-025. 1-015. 1-05:612. 015. 31]-092. 6

АКТИВНОСТЬ МАРКЕРНЫХ ФЕРМЕНТОВ МИОКАРДА У КРЫС ПРИ ПОРАЖЕНИИ ТОКСИЧЕСКИМИ ДОЗАМИ АДРЕНАЛИНА

Алексевич К. О., Фира Л. С., Лихацкий П. Г., Рицик О. Б.

Резюме. Установлено , что в условиях поражения миокарда крыс адреналином в дозе 0,5 мг / кг массы тела активируются процессы липопероксидации, которые достигают максимума через 48 ч от начала эксперимента. Параллельно отмечено интенсификацию процессов окислительной модификации белков и цитолиза плазматических мембран кардиоцитив, на что указывает повышение активности маркерных ферментов миокарда (креатинфосфокиназы, аспартатаминотрансферазы и лактатдегидрогеназы).

Ключевые слова: адреналин, миокард, липопероксидация, окислительная модификация белков, лактатдегидрогеназа, креатинфосфокиназа.

UDC 616/. 12-025. 1-015. 1-05:612. 015. 31]-092. 6

Activity of Myocardium Marker Enzymes in Rats under Adrenaline Toxic Damage

Aleksevych K. O., Fira L. S., Lykhatsky P. G., Rytsyk O. B.

Abstract. *Introduction.* Today, the prevalence and severe consequences of cardiovascular diseases determine the actuality of prevention, diagnostics and treatment.

The prognosis in acute cardiac pathology is known to be based on the dynamics of biochemical markers. Therefore, the dynamics of metabolic processes and correlation of biochemical indices under above-mentioned pathologic conditions are being studied intensively.

The objective of this survey is to study the dynamics of myocardium marker enzymes' activity and their correlation with the indices of free radical oxidation in acute myocardium damage by high adrenaline doses.

Materials and methods. Experiments were performed on 50 non-linear albino male rats (body weight – 180-200 g). Acute adrenaline myocardium damage was induced by single intramuscular injection of 0.185% adrenaline hydrotartrate ("Darnytsya", Ukraine), dose 0.5 mg/kg. The rats were euthanized with the thiopental sodium on the 3rd, 24th and 48th post-injection hour.

Results and discussion. On the 3rd experimental hour, the TBA-AP content revealed 19.2% increase in the blood serum and 32.1% increase in the myocardium in comparison with control values. Through protein oxidative modification studies, it was found that under adrenaline impact the content of neutral aldehyde and keto derivatives revealed 1.7 and 1.4 times increase in the blood serum and myocardium respectively at 3 hours term.

The increase of lactate dehydrogenase activity in the blood serum alongside with the decrease of the enzyme's activity in the myocardium homogenate were found at all experimental terms.

Creatine phosphokinase activity in the blood serum revealed 2.5 times increase 3 hours after damage, in comparison with the controls. Within 24 hours' term after damage, this index was at its peak, revealing 2.7 times excess if compared with controls. By 48 hours, it decreased yet exceeding the control value by 2.3 times. The parallel studies of creatine phosphokinase activity in the myocardium revealed the inverse process, namely 2 times decrease at 3 hours' term, 2.7 times decrease at 24 hours whereas at 48 hours the index was 2.3 times lower in comparison with the control value.

Aminotransferase organo-specificity taken into account, allowing for De Ritis ratio indicating the exact toxic site seemed to be reasonable. 3 hours after the adrenaline damage, De Ritis ratio was found to be roughly similar to the intact controls, even lower. Starting from the 24th experimental hour, the ratio was found to be increasing reaching its peak value 48 hours after the damage had been induced. This is indicative of progressing myocardial ischemia that causes cardiocyte cytolysis.

Conclusion. Adrenaline myocardium damage (0. 5 mg/kg body weight) was shown to activate lipid peroxidation and protein oxidative modification on the 48th experimental hour. Accumulation of free radical reactions' toxins is accompanied by cardiocyte cytolysis that causes the ingress of organo-specific enzymes into the bloodstream. Besides, increased creatine phosphokinase, aspartataminotransferase and lactate dehydrogenase activity in the blood serum of injured rats parallel with their decreased activity in the myocardium were observed.

Keywords: adrenaline, myocardium, lipoperoksidation, oxidizing modification of proteins, lactate dehydrogenase, creatinphosphokinase.

Рецензент – проф. Катеренчук І. П.

Стаття надійшла 5. 06. 2014 р.