

**ВПЛИВ ГІСТАМІНУ ТА ГІПОХЛОРИТУ НАТРІЮ НА ПРООКСИДАНТНИЙ
СТАН І РІВЕНЬ СІАЛОВИХ КИСЛОТ В ЕРИТРОЦИТАХ ЩУРІВ**

Н. Гарасим, О. Бішко-Москалюк, С. Пстрий, Д. Санагурський

*Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: garasymnataly@gmail.com*

Вивчено вплив гістаміну в дозі 1 і 8 мкг/кг та гіпохлориту натрію (ГХН), концентрацією 5 і 20 мг/л, на перебіг вільнорадикальних процесів і на вміст сіалових кислот у еритроцитах щурів на 1, 7, 14-ту добу дослідження, а також після реабілітаційного періоду (21-ша доба). Встановлено, що гістамін порушував процеси ліпопероксидації з утворенням гідропероксидів та ушкоджував протеїни, про що свідчить зміна вмісту карбонільних груп білків. За дії біогенного аміну в нижчій дозі вміст сіалових кислот знижувався на 1, 7, 14-ту доби на 68, 42, 53 % відповідно. Такі зміни виявлено і за впливу вищої дози упродовж його довготривалої дії. ГХН на фоні впливу гістаміну спочатку інтенсифікував, а потім сповільнював процеси ліпопероксидації. Переважаюче зниження кількості карбонільних груп протеїнів за одночасної дії речовин відбувалося впродовж дослідження, крім впливу біогенного аміну й оксиданта в концентрації 20 мг/л на 7-му добу дослідження, за якого вміст підвищувався на 50 %. Зниження вмісту сіалових кислот у еритроцитах щурів на 1-шу добу дослідження відбувалося за поєднаної дії гістаміну та ГХН на 32–64 %. Проте вже на 7-му добу вміст сіалових кислот зростав (на 8 і 94 % відповідно). До подібних змін призводило і впоювання тваринам тільки ГХН обох досліджуваних концентрацій. За допомогою двофакторного дисперсійного аналізу встановлено, що на показники вільнорадикальних реакцій (гідропероксидів ліпідів, ТБК-активних продуктів, карбонільних груп протеїнів) суттєвий вплив виявляло впоювання ГХН, а на вміст сіалових кислот – одночасне введення гістаміну і ГХН. Таким чином, гістамін порушує процеси ліпопероксидації з утворенням гідропероксидів ліпідів, ушкоджує протеїни та знижує вміст сіалових кислот, що веде до зміни поверхневого заряду еритроцитів. За поєднаної дії гістаміну і ГХН у низькій концентрації останній коригує показники прооксидантного стану еритроцитів, що є позитивним ефектом. За період реабілітаційного періоду після одночасної дії гістаміну і ГХН усіх досліджуваних концентрацій вміст гідропероксидів ліпідів, ТБК-активних продуктів, карбонільних груп протеїнів і сіалових кислот переважно знижується.

Ключові слова: гістамін, гіпохлорит натрію, еритроцити

Оксидативний стрес проявляється у стійкому зсуві балансу прооксидантних і антиоксидантних процесів, зумовлюючи цитотоксичні порушення. Він призводить до пошкодження найважливіших біополімерів клітини: нуклеїнових кислот, протеїнів і ліпідів. Високі концентрації активних форм кисню і ліпідних гідропероксидів пошкоджують ДНК, впливають на поділ клітин і можуть активувати апоптоз [5].

Поверхневий рецепторний апарат клітинної мембрани є однією з найважливіших систем, що забезпечує життєдіяльність клітин. Кількість рецепторів за різних умов функціонування клітини може змінюватись, але їхня структура залишається відносно стабільною. Вона представлена переважно глікопротеїнами, вуглеводна частина яких у вигляді олігосахаридних ланцюгів утворює надмембранні комплекси, які відіграють

ключову роль у механізмах міграції, адгезії, проліферації й апоптозу клітин. Проте за різних патологічних станів можливі зміни кількісних і якісних характеристик поверхневих глікокон'югатів клітин [10], зокрема, сіалових кислот.

Відомо, що патологічні процеси у мембранах клітин тканин уже на ранніх етапах їхнього розвитку впливають на стан еритроцитарної мембрани, яка є інформативним об'єктом для діагностики патології [7]. Еритроцити мають високу чутливість до впливу хімічних речовин, що дає змогу визначати певну специфіку їхньої дії, а також встановити залежність ступеня вираженості морфофункціональних змін еритроцитів від інтенсивності шкідливого впливу [2]. Відсутність органел робить еритроцит зручною моделлю для вивчення впливів шкідливих факторів безпосередньо на клітинні мембрани. Еритроцитарні мембрани проявляють високу чутливість до активації пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), яка швидко та різко змінює їхні властивості. Накопичення гідрофільних угруповань у гідрофобному шарі мембрани сприяє утворенню в мембрані своєрідних пор і порушує мембранний транспорт, у тому числі селективний. Пошкодження мембранозв'язаних ензимів з інгібуванням їхньої активності та зміна властивостей мембранних протеїнів-переносників є додатковим механізмом патологічного ефекту ПОЛ. Зменшення міцності мембран еритроцитів і збільшення гемолізу клітин є однією з ланок включення еритроцита в «ланцюжок» змін, які мають велике значення у розвитку тромбоутворення [7].

На сьогодні залишається невивченою дія гістаміну (який чинить як регуляторний, так і патологічний вплив на різні органи і тканини організму) на еритроцити. На клітинному рівні він впливає через гістамінорецептори (H1, H2, H3, H4). Проте невідомим є те, чи наявні на мембрані еритроцитів такі рецептори.

У медицині застосовують гіпохлорит натрію (ГХН) з метою дезінтоксикації організму під час отруєнь. Його використовують у стоматології для обробки кореневих каналів, в урології, санації ран і т. п. [3, 6, 8]. Ця речовина є потужним окисником. Відомо, що у світі з кожним роком зростає кількість людей із гістамін-опосередкованими реакціями, зокрема, з алергіями. Тому важливо вивчити безпечність застосування ГХН у медицині для лікування пацієнтів, які мають алергічні прояви, а отже, і надмірне виділення гістаміну тканинними базофілами та базофілами крові. Такі дослідження є актуальними з огляду на те, що гіпохлоритом натрію незаражують водопровідну воду, і щоденне її вживання зумовлює систематичне його потрапляння в організм споживачів, спричиняючи різні гістамінопосередковані прояви (бронхоспазм, кропив'янка, головний біль, закладеність носа, свербіж, аритмія та ін.). Є повідомлення, що ГХН знижує вміст гістаміну в крові людей за важких отруєнь психофармакологічними речовинами [16]. Відомо також, що гістамін легко піддається окисненню.

Мета нашої роботи – дослідити вплив одночасної дії гістаміну та ГХН на процеси ліпопероксидації, оксидативну модифікацію протеїнів і вміст сіалових кислот як показників ступеня ушкодження еритроцитів щурів.

Матеріали та методи

Досліди проводили на безпородних білих щурах-самцях масою 180–220 г протягом 21 доби. Тварин відбирали за принципом аналогів по 20 голів у кожній групі. До 1-ї контрольної групи увійшли інтактні тварини. Тваринам 2-ї та 3-ї груп протягом 14 діб підшкірно вводили розчини гістаміну в дозах 1 та 8 мкг/кг (виготовлені з 0,01 % гістаміну дигідрохлориду) маси тіла відповідно. Такі дози зумовлюють патологічні прояви в експериментальних умовах [11]. Тваринам 4-ї та 5-ї груп протягом цього терміну випоювали розчин ГХН (5 і 20 мг/л відповідно). Крім того, було сформовано ще чотири групи, тваринам яких сумісно вводили гістамін і ГХН. На 1, 7, 14 та 21-шу (реабілітаційну) добу по 5

тварин із кожної групи декапітували під легким ефірним наркозом із дотриманням вимог Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, яких використовують з експериментальною та науковою метою (Страсбург, 1986) та згідно з “Загальними принципами роботи на тваринах”, затвердженими I Національним конгресом з біоетики (Київ, Україна, 2001). Відбирали еритроцити з гепаринізованої крові та проводили гемоліз дистильованою водою у співвідношенні 1:5. Вміст протеїну в кожному зразку вимірювали за методом Лоурі. Визначали інтенсивність процесів ліпопероксидації за вмістом первинних і вторинних продуктів ПОЛ – гідропероксидів і ТБК-активних продуктів (продуктів, які взаємодіють з тіобарбітуровою кислотою) [14, 18]; стан поверхневого рецепторного апарату еритроцитарної мембрани – за вмістом сіалових кислот методом Гесса [13]. Оксидативну модифікацію протеїнів вивчали за вмістом карбонільних груп нейтрального й основного характеру [12]. У результаті окиснення протеїнів, залежно від переважання в їхніх молекулах амінокислот нейтрального (валін, лейцин, ізолейцин та ін.) або основного (лізин, аргінін та ін.) характеру, утворюються альдегідо- або кетонпохідні нейтрального або основного характеру. За довжини хвилі 370 нм визначали похідні нейтрального, а за 430 нм – основного характеру.

Статистичну обробку результатів досліджень і двофакторний дисперсійний аналіз проводили, використовуючи програму «Excel-2010» для Windows. Для оцінки вірогідності різниці двох альтернативних сукупностей результатів обчислювали коефіцієнт *t* Стьюдента. Вірогідною вважалася різниця за $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$, $P \leq 0,001$.

Результати і їхнє обговорення

Встановлено, що гістамін у дозі 1 і 8 мкг/кг в еритроцитах щурів підвищував вміст гідропероксидів ліпідів на 1-шу добу досліду, тоді як кількість ТБК-активних продуктів знижувалася тільки за нижчої концентрації. На 7-му добу інтенсивність процесів ліпопероксидації поверталася до меж контролю, проте вже на наступному часовому етапі дослідження вміст гідропероксидів ліпідів підвищувався (на 127 %) за дії гістаміну нижчої дози та знижувався (на 19 %) за впливу вищої (рис. 1, а, б). Після реабілітаційного періоду інтенсивність накопичення вторинних продуктів ПОЛ зростала в середньому у 10 разів за впливу біогенного аміну обох досліджуваних доз, тоді як така ж тенденція зафіксована під час вивчення вмісту первинних продуктів ліпопероксидації за дії досліджуваної речовини у вищій дозі. Отже, гістамін зумовлює зміни в накопиченні гідропероксидів ліпідів (первинних продуктів ПОЛ), які мають динамічний характер. Ці зміни свідчать, що гістамін у еритроцитах зумовлює оксидативний стрес. Поліненасичені жирні кислоти, такі як арахідонова та лінолева кислоти, важливі компоненти клітинних мембран і ліпопротеїнів, є основними мішенями для ПОЛ, під час яких утворюються гідропероксиди ліпідів як первинні продукти, а потім вони окиснювально деградують до різних альдегідів – вторинних продуктів [27]. Вміст ТБК-активних продуктів, які відображають вміст малонового діальдегіду на рівні контролю або навіть нижче, свідчить про обривання ланцюга процесу ПОЛ на рівні первинних продуктів системою антиоксидантного захисту. Відомо, що в еритроцитах ця система добре розвинута. Значне підвищення вмісту ТБК-активних продуктів після реабілітаційного періоду, ймовірно, відбувається за рахунок порушення про- і антиоксидантної системи еритроцитів. Відомо, що накопичення продуктів ПОЛ може призвести до структурних і функціональних змін, фізичних властивостей клітин, навіть до їхньої смерті [24]. У науковій літературі немає відомостей про наявність на мембранах еритроцитів рецепторів до гістаміну, тому, ймовірно, його дія на еритроцити є опосередкованою через функціональні зміни інших формених елементів крові, зокрема, нейтрофілів, еозинофілів і тромбоцитів. Відомо, що гістамін, залежно від концентрації, зумовлює підвищення або зниження вивільнення нейтрофілами активних форм кисню [9]. Таким чином, активні форми кисню

(які вивільняються понад норму) ушкоджують мембрани еритроцитів шляхом інтенсифікації процесів ПОЛ. Відомо також, що пероксид водню легко проникає крізь мембрани й інтенсифікує процеси ліпопероксидації у внутрішньому середовищі клітин.

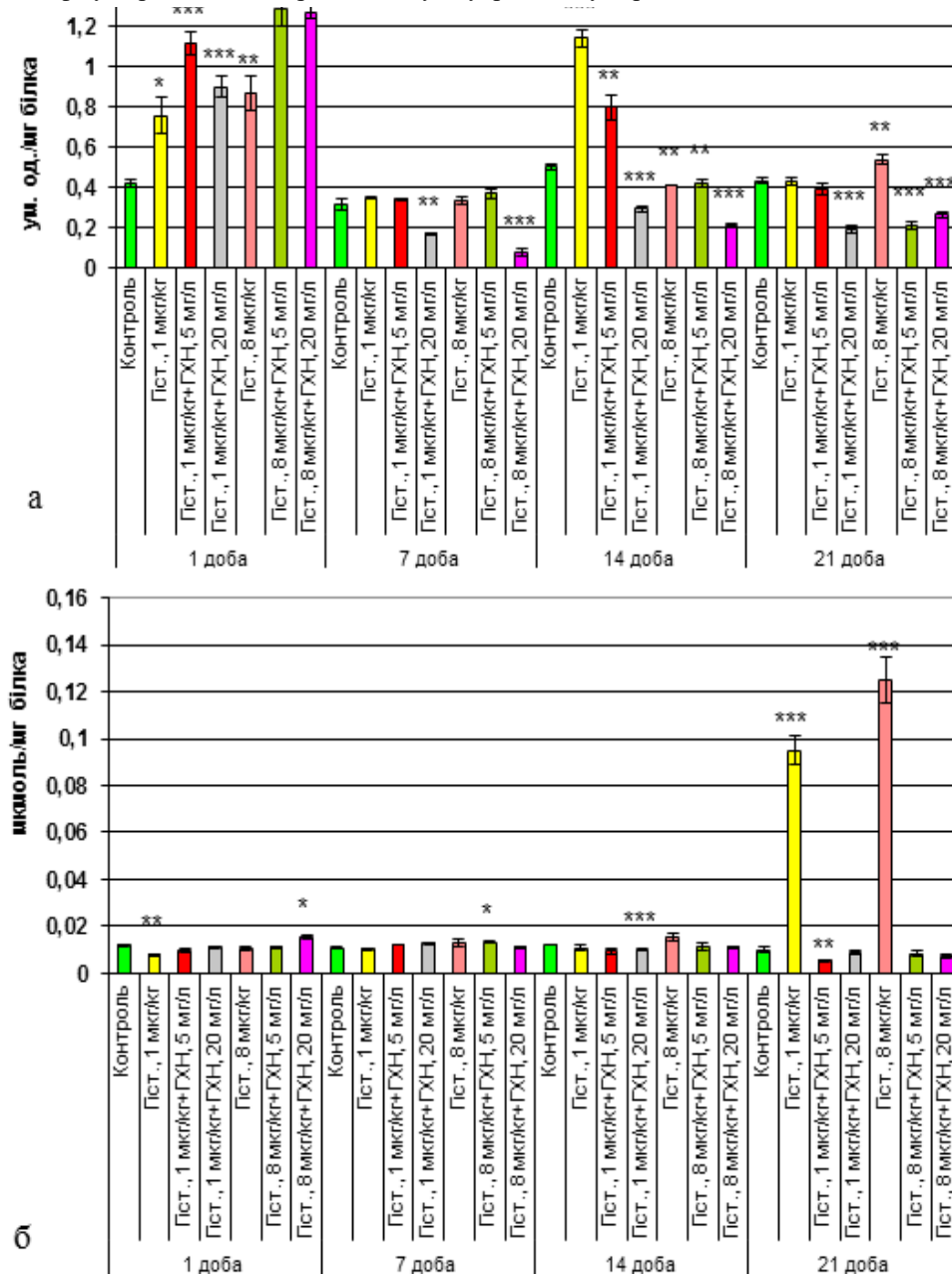


Рис. 1. Вміст гідропероксидів (а) і ТБК-активних продуктів (б) у гемолізатах еритроцитів щурів на 1-шу, 7-му, 14-ту і 21-шу (реабілітація) добу дослідження за дії гістаміну в дозі 1 і 8 мкг/кг, а також за сумісного впливу гістаміну та гіпохлориту натрію в концентрації 5 і 20 мг/л; * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$

Додавання до питної води ГХН у еритроцитах щурів на початку досліду зумовлювало підвищення вмісту гідропероксидів ліпідів на 67 і 96 % відповідно у нижчій і вищій концентраціях, тоді як на 7-му добу вміст ТБК-активних продуктів підвищувався за впливу цієї речовини в концентрації 5 мг/л на 58 % (рис. 2). Довготривале випоювання тваринам ГХН зумовлювало зниження інтенсивності процесів ПОЛ порівняно з контролем, яке зберігається навіть після реабілітаційного періоду (зменшення вмісту гідропероксидів ліпідів на 24 %). Потрібно зазначити, що тенденція до першопочаткового підвищення накопичення продуктів ліпопероксидації з подальшим зниженням є такою ж, як і за одночасного введення в організм щурів гістаміну і ГХН, що свідчить про домінуючий вплив останнього на процеси ПОЛ.

Відомо, що внаслідок дії гідропероксидів ліпідів відбувається утворення вільних радикалів, лабілізація лізосом, вивільнення протеолітичних ензимів тощо. Це, у свою чергу, призводить до утворення високотоксичних для клітини продуктів – спиртів, кетонів, альдегідів, накопичення яких спричиняє пошкодження мембранозв'язаних ензимів, порушення мембранного транспорту і, як наслідок, загибель клітин [15]. Проте зниження інтенсивності процесів ПОЛ є теж негативним явищем, оскільки відомо, що фізіологічні рівні окиснювачів також модулюють клітинні функції через гомеостатичні каскади, що сигналізують про редокс-чутливість клітин [26]. Продукти ПОЛ є невід'ємною частиною здорового організму та сприяють підтриманню сталого біохімічного статусу клітин [17]. Зниження вмісту продуктів ліпопероксидації зумовлює зміну жорсткості мембрани, що відображається на її проникності. Відомо, що ця функція у еритроцитів є надзвичайно важливою. Мікров'язкість мембран менша, якщо у складі ліпідів переважають ненасичені жирні кислоти, і більша за високого вмісту насичених жирних кислот [4].

За сумісного введення в організм щурам гістаміну і ГХН на першу добу значно підвищувався вміст гідропероксидів ліпідів у середньому в три рази (порівняно з контролем), тоді як кількість ТБК-активних продуктів лишалася на рівні контролю, окрім одночасної дії цих сполук максимальних концентрацій (підвищення вмісту на 30 %). Комбінація гістаміну в дозі 8 мкг/кг та ГХН у концентрації 5 мг/л зумовлювала тільки незначне підвищення кількості вторинних продуктів ліпопероксидації на 7-му добу. Проте випоювання тваринам ГХН у вищій концентрації на фоні дії гістаміну знижувало вміст гідропероксидів ліпідів. Треба відмітити, що за підшкірного введення тільки гістаміну на цю добу досліду інтенсивність процесів ПОЛ була у межах контролю. Зменшення вмісту гідропероксидів ліпідів зафіксовано і на 14-ту, і на 21-шу (реабілітація) доби досліду за поєданого впливу гістаміну та ГХН, окрім дії цих речовин у нижчих концентраціях за двотижневого введення. У цей час вміст первинних продуктів ліпопероксидації підвищувався на 59 % (див. рис. 1, а, б). Отже, ГХН на фоні дії гістаміну спочатку інтенсифікує, а потім уповільнює процеси ліпопероксидації, про що свідчить вміст первинних продуктів ПОЛ. У мембранах утворення гідропероксидів ліпідів відбувається за наявності біологічно важливих окиснювачів, таких як іони металів, пероксинітриту, НОСІ та цитохрому с [25]. Відомо, що під час взаємодії ГХН із водою можливе утворення НОСІ. Подальше зниження інтенсивності процесів ПОЛ зумовлене, ймовірно, реагуванням ГХН із гістаміном і нівелюванням впливу останнього. Встановлено, що ГХН покращує реологічні властивості крові, зв'язується з продуктами процесів ліпопероксидації і перетворює їх на гідрофільні сполуки, які легко вимиваються з мембран, а це зумовлює їхнє оновлення [16].

Проведений двофакторний дисперсійний аналіз дав змогу встановити ступінь впливу гістаміну, ГХН і їхньої сумісної дії. Нами виявлено, що на вміст гідропероксидів ліпідів значний вплив здійснювали ГХН на 7-му та 21-шу доби (54 і 61 % відповідно), тоді як

гістамін провідну дію спричинював на 1-шу та 14-ту (48 і 38 % відповідно; рис. 3). Однаковий незначний вплив на вміст первинних продуктів ліпопероксидації виявляло сумісне введення гістаміну і ГХН, починаючи з 7-ї доби і до кінця досліду. На вміст ТБК-активних продуктів значну дію чинить гістамін на 14-ту добу (частка впливу 41 %), тоді як інші речовини у різних комбінаціях зумовлювали менш виражений вплив на вміст цих продуктів ліпопероксидації. Це свідчить, що на первинні продукти ПОЛ впливає лише ГХН.

Досліджуючи стан оксидативної модифікації протеїнів, встановили, що в еритроцитах щурів гістамін знижував вміст карбонільних груп основного і нейтрального характеру на початку досліду приблизно на 50 %, проте подальше підшкірне введення препарату зумовлювало інтенсифікацію цих процесів, а це свідчить про їхнє вільнорадикальне ушкодження (рис. 4, а, б). Відомо, що еритроцити містять 95 % (від сухої маси) гемоглобіну і що тільки 5 % припадає на інші сполуки: ліпіди й інші протеїни [20]. Тому можна припустити, що в еритроцитах гістамін ушкоджує, в першу чергу, молекули гемоглобіну. Такий ефект можливий, оскільки відомо, що гістамін змінює реологічні властивості крові внаслідок збільшення проникності стінок судин для води, а це призводить до порушення газообміну. Сукупність цих процесів зумовлює патологічне окиснення гемоглобіну до метгемоглобіну, з утворенням супероксид-аніон радикала, які призводять до оксидативної модифікації протеїнів. Відомо, що амінокислоти (зокрема, ті, які входять до складу гемоглобіну) здатні до модифікацій шляхом окиснення, азотування, фосфорилування тощо [23]. Інтенсифікація оксидативної модифікації протеїнів за впливу гістаміну може відбуватися внаслідок підвищення вмісту вільних радикалів кисню (вивільнені нейтрофілами у відповідь на стимул біогенним аміном), а також дії продуктів ліпопероксидації (вміст яких підвищується). На 21-шу добу досліду (після припинення введення в організм щурів гістаміну) вміст карбонільних груп протеїнів значно знижується (приблизно на 70 %).

Нами виявлено, що ГХН у обох досліджуваних концентраціях зумовлював зниження вмісту карбонільних груп протеїнів як нейтрального, так і основного характеру порівняно з контролем. Причому речовина у нижчій концентрації зумовлювала більш інтенсивне їхнє зниження (приблизно на 60 %), ніж у вищій (приблизно на 30 %) на 1-шу добу (див. рис. 2). Двотижневе вполювання ГХН у концентрації 20 мг/л спричиняло зниження вмісту в еритроцитах щурів тільки карбонільних груп протеїнів нейтрального характеру на 25 %. Проте після реабілітаційного періоду сповільнення інтенсивності оксидативної модифікації протеїнів відновлюється (зниження вмісту відповідних продуктів приблизно на 50 %). Отже, ГХН спричиняє переважаюче зниження процесів ПОЛ і оксидативної модифікації протеїнів, порівняно з контролем, у еритроцитах щурів. Відомо, що ГХН є потужним оксидантом, який спричиняє у клітинах інтенсифікацію вільнорадикальних процесів. Також відомо, що еритроцити мають особливий метаболізм, порівняно з іншими клітинами організму. Так, у цих клітинах, які позбавлені органел та ядра, основним шляхом утворення енергії є анаеробний гліколіз (90 %), на пентозофосфатний шлях припадає 10 %, наявна потужна система антиоксидантного захисту. Тому в еритроцитах не відбувається «витоку» вільних радикалів, які посилюють процеси ПОЛ та оксидативну модифікацію протеїнів на тлі дії ГХН, а, відповідно, вони є стійкими до дії оксидантів.

Переважаюче зниження кількості карбонільних груп протеїнів за одночасної дії гістаміну і ГХН виявлене впродовж досліду, крім впливу біогенного аміну й оксиданта в концентрації 20 мг/л на 7-му добу досліду, за якого вміст підвищується на 50 %, порівняно з контролем (див. рис. 4, а, б). Сповільнення інтенсивності оксидативної модифікації протеїнів відбувається за активації протеасомного комплексу, який відповідає за протеолітичну деградацію ушкоджених протеїнів, що лежить в основі адаптаційних процесів [1]. Відомо,

що еритроцити відіграють провідну роль у підтриманні гомеостазу організму, тому можна припустити, що сумісна дія гістаміну і ГХН у нижчій концентрації (наявний синергетичний ефект) активує такий захисний процес.

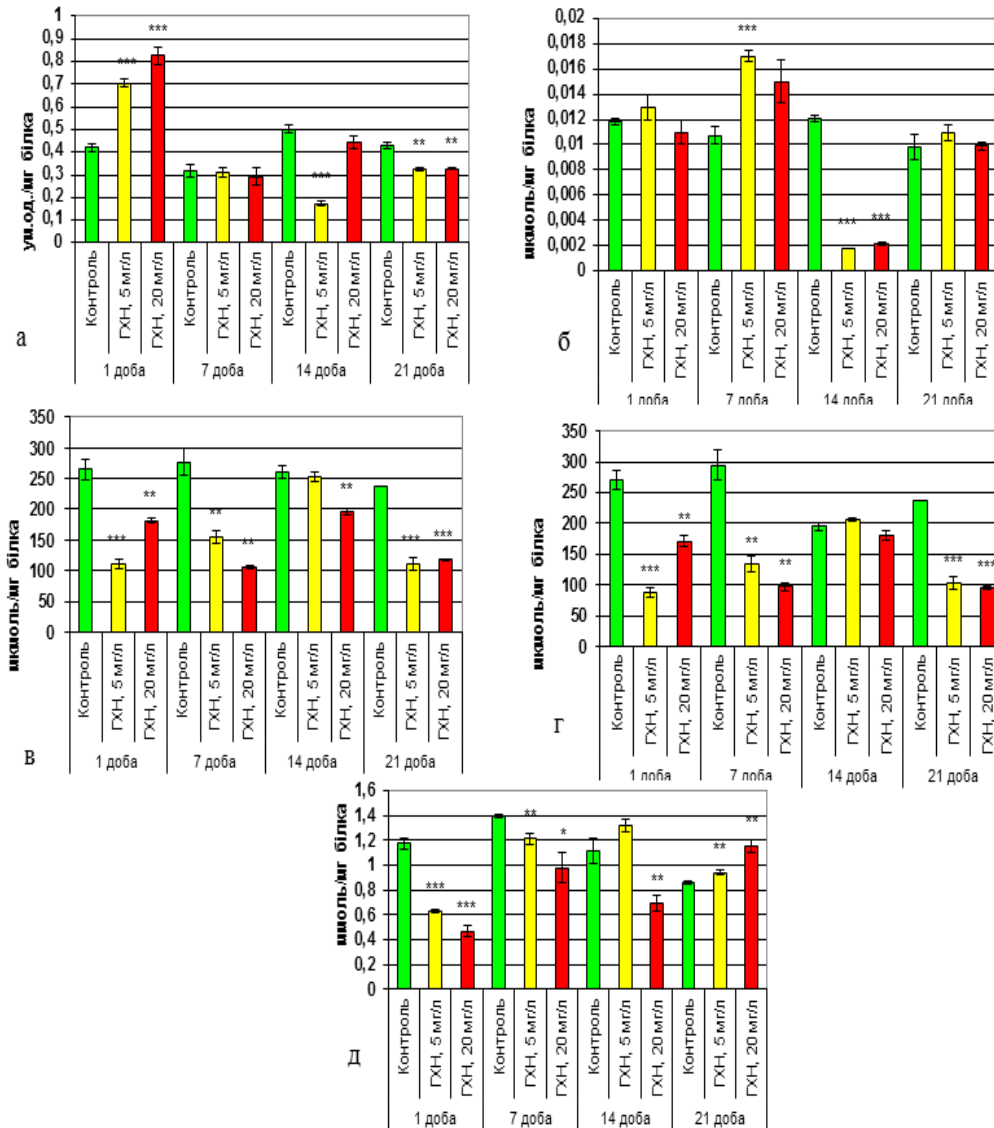


Рис. 2. Вміст гідропероксидів (а), ТБК-активних продуктів (б), карбонільних груп протеїнів нейтрального (в) та основного характеру (г), сіалових кислот (д) у гемолізатах еритроцитів щурів на 1-шу, 7-му, 14-ту і 21-шу добу дослідження в контролі та за впливу гіпохлориту натрію в концентрації 5 і 20 мг/л; * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$

Досліджуючи частки впливу ГХН на вміст карбонільних груп протеїнів як нейтрального, так і основного характеру, встановлено його провідну дію на 7-му і 14-ту доби (приблизно 50%). На початковому і кінцевому етапах дослідження на вміст карбонільних груп протеїнів нейтрального характеру значну дію має гістамін (частки впливу 40 і 56 %

відповідно). Частки впливу одночасного введення гістаміну і ГХН на оксидативну модифікацію протеїнів основного характеру є значними (45 і 42 %) на 1-шу і 14-ту доби досліджу (див. рис. 4). Це свідчить про неоднакову дію самого гістаміну і гістаміну в поєднанні з ГХН на вміст карбонільних груп протеїнів основного та нейтрального характеру.

Встановлено, що за дії гістаміну в дозі 1 мкг/кг вміст сіалових кислот знижувався на 1-шу, 7-му, 14-ту доби на 68, 42, 53 % відповідно. Зниження вмісту цих продуктів було виявлено за впливу вищої дози біогенного аміну, як на 7-му, так і на 14-ту доби відповідно на 58 і 71 % (див. рис. 4, в). Відомо, що заряд поверхні плазматичної мембрани еритроцитів залежить від вмісту в структурі вуглеводних компонентів мембранних глікокон'югатів сіалових кислот, які більш ніж на 60 % визначають сумарний негативний заряд. Зниження рівня сіалових кислот може бути як абсолютним (наприклад, алкоголь різко знижує кількість сіалових кислот; віруси мають нейрамідазну активність), так і відносним (екранування сіалових кислот високомолекулярними протеїнами, які адсорбуються на поверхні еритроцитів із плазми). Десіалювання вуглеводних компонентів призводить до захоплення еритроцитів галактозоспецифічними лектинами в печінці та видалення їх із кров'яного русла. Пошкоджені еритроцити впізнаються також рецепторами макрофагів, лігандом для яких є сіалоолігосахаридні ланцюги кластеризованого або агрегованого глікофору. Зміна кількості сіалових кислот на поверхні клітини призводить до збільшення їхніх адгезивних властивостей [10]. Тому зниження вмісту сіалових кислот свідчить про ушкодження еритроцитів за дії гістаміну. Після припинення введення цього біогенного аміну вміст цих досліджуваних кислот повертається до контрольних значень. Відомо, що за фізіологічних умов кількість сіалових кислот у складі поверхневих гліканів регулюється активністю мембранозв'язаних сіалідаз (родини ензимів, які здійснюють десіалювання надмембранних компонентів), які визначають тривалість циркулювання еритроцитів у кров'яному руслі [19]. Можна припустити, що гістамін, шляхом дії на гістамінорецептори, активує сіалідазу, проте таке твердження потребує додаткового дослідження.

Отже, можна зробити висновок, що гістамін порушує процеси ліпопероксидації з утворенням гідропероксидів, ушкоджує протеїни та знижує вміст сіалових кислот, що веде до зміни поверхневого заряду еритроцитів.

Випоювання тваринам ГХН знижувало вміст сіалових кислот упродовж усього терміну його введення, крім концентрації 5 мг/л на 14-ду добу. На початкових етапах досліджу зниження вмісту цих сполук є більш виражене (за дії нижчої концентрації на 47 %, за впливу вищої – на 60 %), проте в подальшому сповільнення інтенсивності є менш виражене (див. рис. 2). Після припинення випоювання ГХН у нижчій і вищій концентрації вміст сіалових кислот підвищується порівняно з контролем на 9 і 34 % відповідно. У науковій літературі є повідомлення, що поліклональне антитіло S реагує з Met29 глікофору В еритроцитів, але може зв'язуватися зі сусідніми амінокислотами. ГХН різних концентрацій впливає на взаємодію поліклонального антитіла S із глікофорином В через дію на сіалові кислоти, які є на поверхні останнього [22]. Отже, нами й іншими дослідниками показано, що ГХН впливає на вміст сіалових кислот на поверхні еритроцитів, що, у свою чергу, змінює рецепцію цих клітин. Підвищення вмісту сіалових кислот після реабілітаційного періоду є позитивним явищем, що свідчить про поступове відновлення функціональних властивостей еритроцитів після дії ГХН.

Нами виявлено зниження вмісту сіалових кислот в еритроцитах щурів на 1-шу добу досліджу за поєднаної дії гістаміну (1 і 8 мкг/кг) та ГХН (5 і 20 мг/л) на 32–64 %. Проте вже на 7-му добу за одночасного впливу цих речовин у низьких і високих концентраціях вміст сіалових кислот зростає (на 8 і 94 % відповідно). Подальше введення щурам досліджува-

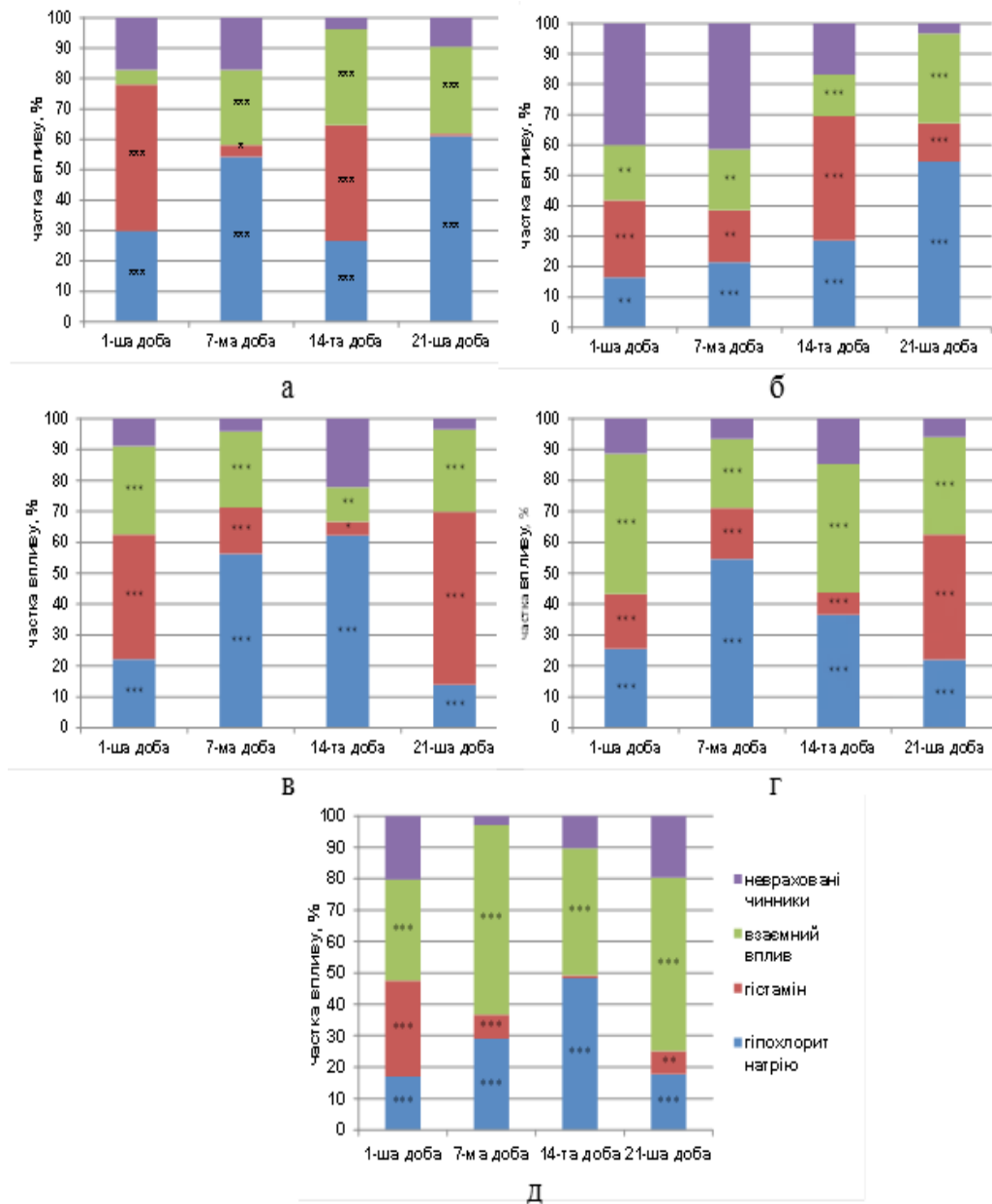


Рис. 3. Результати двофакторного дисперсійного аналізу показників прооксидантного стану (а – гідропероксида; б – ТБК-активні продукти; в, г – карбонільні групи протеїнів нейтрального й основного характеру відповідно; д – сіалові кислоти) у гемолізатах еритроцитів щурів за впливу гістаміну й гіпохлориту натрію; * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$

них речовин повертало кількість цих кислот до контрольних значень (див. рис. 4, в). Отже, поєднана дія гістаміну і ГХН не чинить значного негативного впливу на глікокалікс мембран еритроцитів. Відомо, що сіалові кислоти відіграють важливу біологічну роль. Перш за все, вони зумовлюють основні біофізичні ефекти клітини. Сіалові кислоти зумовлюють

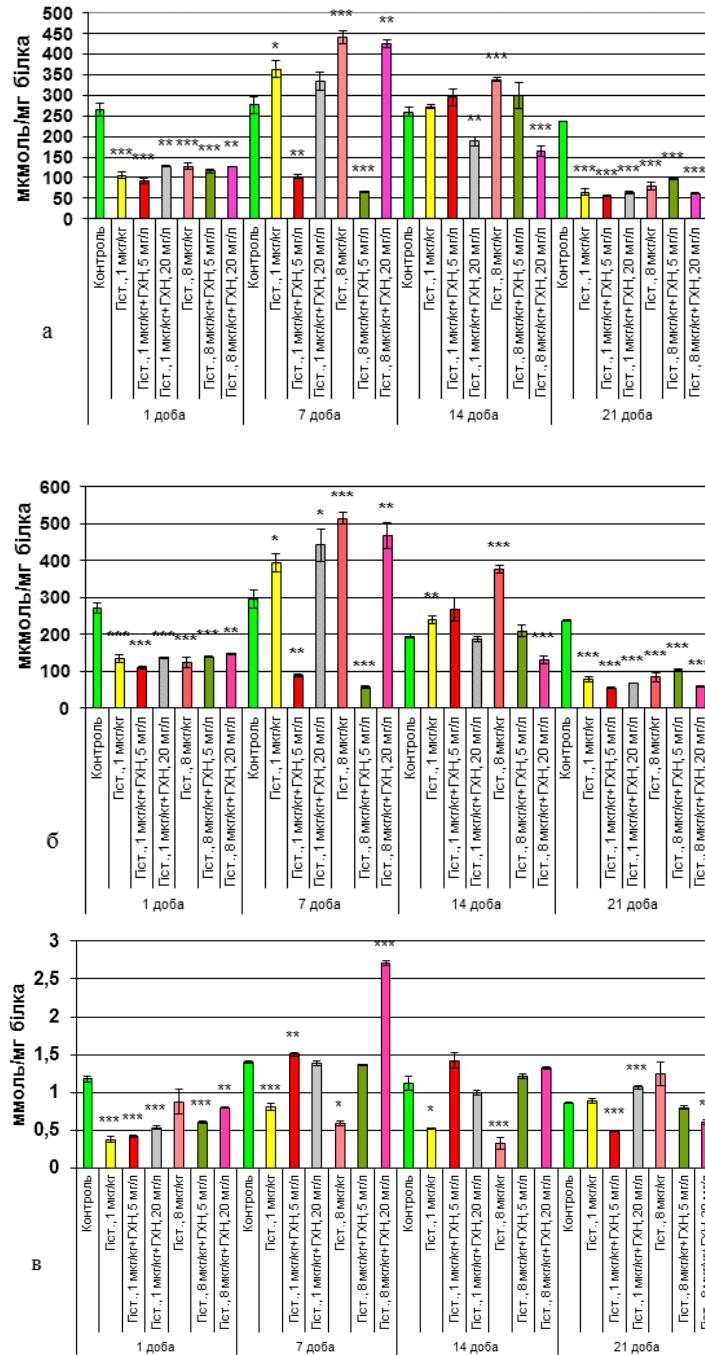


Рис. 4. Вміст карбонільних груп протеїнів нейтрального (а) та основного характеру (б), сілових кислот (в) у гемолізатах еритроцитів щурів на 1-шу, 7-му, 14-ту і 21-шу добу дослідження за дії гістаміну в дозі 1 і 8 мкг/кг, а також за одночасного впливу гістаміну та гіпохлориту натрію у концентрації 5 і 20 мг/л; * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$

відштовхування між клітинами з урахуванням їхнього негативного заряду, вони містяться на всіх поверхнях клітин хребетних (~100 мкм локальної концентрації) і цим впливають на біофізичні властивості клітинних взаємодій. Наявні в крайньому зовнішньому положенні гліканів клітинної поверхні, сіалові кислоти ідеально розташовані для полегшення різних випадків імунного розпізнавання, опосередкованих чутливими рецепторами клітин хазяїна або патогенних чинників. Ці кислоти працюють як “самоасоційовані молекулярні шляхи”, котрі реагують на “рецептори розпізнавання саморегуляції”. Відповідно, у деяких групах крові наявні антигенні варіанти сіалілованих гліканів, що сприяють алогенним відмінностям між популяціями одного й того ж виду (наприклад, групи MN крові у людей та групи крові A/B у кішок). Сіаловий “плащ” також слугує біологічним маскуванням для охоплення потенційно антигенних глікокон’югатів (тобто криптоантигенів) або для блокування взаємодій між певними рецепторами господаря й оголеними гліканами, що лежать в основі. Наприклад, видалення сіалових кислот ендогенними сіалідазами може виявити термінальну галактозу, яка сприятиме механізмові кліренсу галектином через його поперечне зшивання поверхневих молекул або шляхом зв’язування з азіалоглікопротеїновими рецепторами печінки. Навпаки, додавання кінцевих залишків сіалових кислот до глікопротеїнів ефективно збільшує їхній час півжиття або змінює їхній спосіб дії [21]. Після реабілітаційного періоду показники, які відображають ушкоджуючий вплив біогенних чинників, переважно знижувалися за одночасної дії гістаміну і ГХН усіх можливих досліджуваних концентрацій. Це свідчить, що за таких умов еритроцити щурів не відновлюють структурно-функціональних властивостей, а це є негативним явищем.

Двофакторний дисперсійний аналіз дав змогу встановити, що на кількість сіалових кислот в еритроцитах щурів значно впливає гістамін і одночасне введення досліджуваних сполук на 1-шу добу. Проте вже на наступних етапах експерименту переважаюча дія належить гіпохлориту натрію і поєднаному впливу гістаміну та ГХН (див. рис. 3). Такі результати підтверджують опосередковану дію гістаміну на вміст сіалових кислот на поверхні еритроцитів щурів.

У еритроцитах щурів за впливу гістаміну підвищувався вміст гідропероксидів ліпідів, знижувався вміст сіалових кислот, змінювалась інтенсивність оксидативної модифікації протеїнів. Поєднане введення в організм гістаміну і ГХН значно підвищувало вміст первинних продуктів ліпопероксидації на 1-шу добу досліду, проте вже до 14-ї їхній вміст знижувався. За таких умов сповільнювалась інтенсивність оксидативної модифікації протеїнів і знижувалася кількість сіалових кислот. До таких змін призводило і випоювання тваринам тільки ГХН обох досліджуваних концентрацій. За допомогою двофакторного дисперсійного аналізу встановлено, що на показники вільнорадикальних реакцій суттєвий вплив виявляло випоювання ГХН, а на вміст сіалових кислот – одночасне введення гістаміну і ГХН.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Андрійчук А. В., Ткаченко Г. М., Кургалюк Н. М., Ткачова І. В. Динаміка гематологічних показників та маркерів оксидативного стресу у коней української верхової породи під впливом фізичних навантажень // Вісн. Харків. ун-ту. Сер. біол. 2013. Вип. 17. № 1056. С. 148–160.
2. Аништїна О. Л. Дослідження мембранотоксичної дії важких металів на моделі еритроцитів крові *in vitro* // Сучасні проблеми токсикології. 2011. № 1–2. С. 65–69.
3. Бірюкова М. М., Соколова І. І., Худякова М. Б. Дезінфекція кореневих каналів: методи та засоби: навч.-метод. посіб. Х.: ХНМУ, 2016. 64 с.

4. Болдырев А. А., Кяйвярйянен Е. И., Илюха В. А. Биомембранология. Петрозаводск: Изд-во Кар НЦ РАН, 2006. 226 с.
5. Вітушинська М., Матійців Н., Черник Я. Чутливість до умов окисдативного стресу, тривалість життя та нейродегенеративні зміни в структурі мозку у мутантів *Drosophila melanogaster* за генами супероксиддисмутази // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2013. Вип. 62. С. 109–116.
6. Владыка А. С., Суслов В. В., Тарабрин О. А. Инфузионная терапия при критических состояниях. К.: Логос, 2010. 274 с.
7. Гиріна О. М., Карлова О. О., Брюзгіна Т. С. Оцінка ліпідних показників еритроцитів у хворих з метаболічним синдромом // Медична хімія. 2007. Т. 9. № 1. С. 72–75.
8. Зайковський В. В., Лужников Е. А., Суходолова Г. Н. та ін. Применение гипохлорита натрия в терапии алкогольного абстинентного синдрома при острых отравлениях этанолом // Токсиколог. вестн. 2010. № 2. С. 10–16.
9. Искусных А. Ю., Башарина О. В., Артюхов В. Г., Алабовский А. А. Влияние гистамина на функциональные свойства нейтрофилов и интенсивность процесса пероксидного окисления липидов в крови доноров // Вестн. ВГУ. Сер. химия, биология, фармация. 2008. № 1. С. 93–96.
10. Канюка О. П., Філяк Є. З., Сибірна Н. О. Особливості структурно-функціональної організації мембран еритроцитів мишей дикого типу та мишей із нокаутом гена РТТГ // Біологічні студії / *Studia Biologica*. 2011. Т. 5. № 1. С. 97–104.
11. Комаренко А., Терехов А., Воробйова А. Дослідження ролі Н1-рецепторів у реакціях ворітних судин печінки щурів на гістамін // Черкас. нац. ун-т ім. Б. Хмельницького. Сер. біол. 2008. Т. 128. С. 54–58.
12. Мецишен І. Ф., Польовий В. П. Механізм окиснювальної модифікації білків // Буковин. мед. вісн. 1999. Т. 3. № 1. С. 196–205.
13. Морозенко Д. В., Леонтъєва Ф. С. Методи дослідження маркерів метаболізму сполучної тканини у сучасній клінічній та експериментальній медицині // Молодий вчений. 2016. № 2 (29). С. 168–172.
14. Олексюк Н. П., Янович В. Г. Активність про- і антиоксидантних систем у печінці прісноводних риб у різні пори року // Укр. біохім. журн. 2010. № 82 (3). С. 41–48.
15. Особа І. А. Біологічна роль перекисного окиснення ліпідів у забезпеченні функціонування організму риб // Рибогосп. наука України. 2013. № 1. С. 87–96.
16. Петров С. И. Применение гипохлорита натрия в клинической токсикологии: дис. ... д-ра мед. наук. М., 2005, 197 с.
17. Попова Е. М., Коцій І. В. Ліпіди як компонент адаптації риб до екологічного стресу // Рибогосп. наука України. 2007. № 1. С. 49–56.
18. Тимирбулатов Р. Р., Селезнев Е. И. Метод повышения интенсивности свободнорадикального окисления липидосодержащих компонентов крови и его диагностическое значение // Лаб. дело. 1981. № 4. С. 209–211.
19. Ференц І. В., Бродяк І. В., Люта М. Я., Сибірна Н. О. Структурні та кількісні зміни вуглеводних детермінант глікопротеїнів еритроцитарних мембран при введенні агматину за умов експериментального цукрового діабету // Цит. и ген. 2013. Т. 47. № 4. С. 69–79.
20. Шейко Л. М., Бокуть С. Б. Практикум по медицинской и биологической физике. Раздел «Биологическая физика»: Методы биофизических исследований. Минск: МГЭУ им. А.Д. Сахарова, 2011. 64 с.
21. Anu P., Vered Padler-Karavani. Evolution of sialic acids: Implications in xenotransplant biology // *Wiley Xenotransplant*. 2018. N 12424. P. 1–11.

22. Halverson G. R., Reid M. E., Sutherland J., Rhodes M. Evaluation and comparison of three human monoclonal anti-S, two human polyclonal anti-S, and one murine anti-GPB // *Immunohematol.* 1999. Vol. 15. N 4. P. 163–166.
23. Lin Y. W. Structure and function of heme proteins regulated by diverse post-translational modifications // *Arch. Biochem. Biophys.* 2018. N 641. P. 1–30.
24. Michael M., Gaschler Brent R. Stockwell Lipid peroxidation in cell death // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017. Vol. 482. N 3. P. 419–425.
25. Miyamoto S., Di Mascio P. Lipid hydroperoxides as a source of singlet molecular oxygen // *Subcell Biochem.* 2014. N 77. P. 3–20.
26. Radi R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2018. Vol. 115. N 23. P. 5839–5848.
27. Yoshichika Kawai, Erika Nuka. Abundance of DNA adducts of 4-oxo-2-alkenals, lipid peroxidation-derived highly reactivgenotoxins // *J. Clin. Biochem. Nutr.* 2018. Vol. 62. N 1. P. 3–10.

Стаття: надійшла до редакції 17.12.18

доопрацьована 18.03.19

прийнята до друку 04.04.19

EFFECTS OF HISTAMINE AND SODIUM HYPOCHLORITE ON PROOXIDANT STATE IN THE RATS ERYTHROCYTES

N. Harasym, O. Bishko-Moskalyuk, S. Pstry, D. Sanahursky

*Ivan Franko National University of Lviv
4, Hrushevskiy St., Lviv, 79005, Ukraine
e-mail: garasymnataly@gmail.com*

The influence of histamine (1 and 8 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and sodium hypochlorite (SH; 5 and 20 mg/l) on the course of free radical processes and on the content of sialic acids in erythrocytes of rats on 1, 7, 14th day of the experiment, and also after rehabilitation period (21 day). It has been established that histamine interrupted the processes of lipoperoxidation with the formation of hydroperoxides, damaging proteins. Under the action of biogenic amine in the lower dose, the content of sialic acids decreased on 1, 7, 14th day by 68, 42, 53 % respectively. Such changes are also revealed for the effect of a higher dose during its long-term exposure. SH in the background of the influence of histamine initially intensified, and then slowed down the processes of lipoperoxidation. The predominant decrease in the number of proteins carbonyl groups during the simultaneous action of substances occurred during the experiment, except the effect of biogenic amine and oxidant at a concentration of 20 mg/l on the 7th day of the experiment, in which the content increased by 50 %. Reduction of sialic acid content in rats erythrocytes for 1 day of the experiment occurred with the combined action of histamine and SH by 32–64 %. However, at the 7th day, the content of sialic acids increased (by 8 and 94 % respectively). Such changes also led to the presentation of animals only to the SH of both concentrations studied. By means of two-factor dispersion analysis it was established that the indices of free radical reactions showed a significant influence on the casting of SH, and on the content of sialic acids – the simultaneous administration of histamine and SH. Thus, with the combined action of histamine and SH in low concentrations, the latter corrects the parameters of the prooxidant state of erythrocytes, which is a positive effect.

Keywords: histamine, sodium hypochlorite, erythrocytes