

БИОМЕТРИЧНИЙ АНАЛІЗ ПОКАЗНИКІВ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОГО СТАНУ ПЛАЗМИ КРОВІ ЩУРІВ ЗА ДІЇ ГІСТАМІНУ І КВЕРЦЕТИНУ

Н. Гарасим¹, Н. Тойлієв¹, Н. Боднарчук¹, А. Зинь²

*¹Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна*

*²Львівський науково-дослідний експертно-криміналістичний центр
Міністерства внутрішніх справ України
вул. Конюшинна, 24, Львів 79040, Україна*

e-mail: garasymnatalya@gmail.com; nataliya.harasym@lnu.edu.ua

Досліджували закономірності впливу гістаміну у концентраціях 0,01; 0,1; 1; 10 мкМ і кверцетину в концентраціях 0,1; 0,3; 0,5; 1; 3; 5 мМ, а також їхню поєднану дію на прооксидантно-антиоксидантний стан плазми крові щурів, застосовуючи кластерний і факторний біометричні аналізи. Встановили, що експериментальні групи за досліджуваними показниками (ТБК-позитивні продукти, гідропероксиди ліпідів, карбонільні групи протеїнів нейтрального й основного характеру, супероксидний аніон-радикал, супероксиддисмутаза, каталаза, відновлений глутатіон, АТФ) розподілилися між 13 кластерами (згідно з кластерним аналізом). В одній групі подібності виявилася дія гістаміну в концентраціях 0,01 мкМ і 1 мкМ. Подібний вплив на показники прооксидантно-антиоксидантного стану плазми крові чинять кверцетин у концентрації 0,5 мМ і гістамін у концентрації 0,1 мкМ. Поєднане додавання до крові гістаміну в концентрації 10 мкМ і кверцетину в концентраціях 0,1; 0,5; 3 мМ зумовлюють однакові зміни зазначених досліджуваних показників. Кластерний аналіз також об'єднав поєднану дію гістаміну в концентрації 0,01 мкМ і кверцетину в концентраціях 0,1 і 3 мМ. Важливо зазначити, що у тих кластерах, до експериментальних груп крові яких додавали і гістамін, і кверцетин, встановлено зниження вмісту карбонільних груп протеїнів, що свідчить про зменшення ураження протеїнів унаслідок процесів вільнорадикального окиснення. Застосовуючи факторний аналіз, встановили наявність трьох прихованих факторів, які впливають на процеси вільнорадикального окиснення крові за дії гістаміну і кверцетину. Виявлено високу кореляцію фактора I з карбонільними групами протеїнів, відновленим глутатіоном, супероксидним аніон-радикалом. Фактор II найбільше корелює з АТФ, супероксиддисмутазою, гідропероксидами ліпідів. Висока тіснота взаємозв'язку є між фактором III і ТБК-позитивними продуктами й каталазою. Враховуючи тісноту взаємозв'язку, факторові I було надано назву «фактор дії на білки», факторові II – «фактор дії на біоенергетику та ініціатор процесів пероксидного окиснення ліпідів», факторові III – «фактор посилення процесів пероксидного окиснення ліпідів». Встановлено, що кверцетин активує фактор I (вплив на білки, зумовлюючи їхнє окиснення) та фактор III (посилення процесів пероксидного окиснення ліпідів) залежно від концентрації препарату. Кверцетинові у концентрації 1 мМ належать властивості обох факторів (I і III).

Ключові слова: плазма крові, гістамін, прооксидантно-антиоксидантний стан, кверцетин, кластерний аналіз, факторний аналіз

Активация пероксидного окиснения липидов (ПОЛ) відбувається за дії різних шкід-

ливих чинників. Пускові механізми стресового пошкодження порушують клітинний метаболізм, уражують клітинні та субклітинні мембрани. Малоновий діальдегід (МДА) є основним кінцевим продуктом у процесах пероксидного окиснення ліпідів. Він має тривалий термін «життя» і високу реакційну здатність, що дає йому змогу взаємодіяти з протеїнами. Збільшення вмісту МДА у клітинах пов'язане з різними процесами, які можуть спричиняти тканинні пошкодження у разі запалення, раку та старіння. Крім того, його використовують як маркер пошкодження, спричиненого окиснювальним стресом [10, 11].

Модифікація протеїнів може бути наслідком кількох метаболічних процесів і часто індукується незбалансованою функцією клітин або запальними й окиснювальними факторами. Модифіковані протеїни накопичуються в периферичній крові, ймовірно, через фізіопатологічні стани. Підвищений окиснювальний стрес індукує посттрансляційні модифікації протеїнів, включаючи глікацію, глікооксидацію, ліпооксидацію і карбонілювання. Оксидативний стрес визначають як дисбаланс між концентрацією вивільнених оксидантів і активністю антиоксидантних процесів в організмі. Отже, оксидативний стрес сприяє окисненню молекул, зокрема, ДНК, ліпідів і протеїнів. У крові окиснюванню піддаються альбуміни, ліпопротеїни низької щільності [11].

Для нейтралізації надлишку ПОЛ та підтримання постійної внутрішньоклітинної концентрації вільних радикалів і ліпопероксиду спрацьовує система антиоксидантного захисту [12]. Система антиоксидантного захисту сформована з ферментативних і неферментативних антиоксидантів. До ферментативних антиоксидантів належать супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіонпероксидаза і глутатіонредуктаза, які відіграють вирішальну роль у гомеостазі активних форм кисню в організмі. Супероксиддисмутаза каталізує перетворення $O_2^{\cdot-}$ до H_2O_2 . Глутатіонпероксидаза і глутатіонредуктаза є членами родини ферментів глутатіонової ланки (GSH). Глутатіонпероксидаза використовує GSH як субстрат, що забезпечує розкладання H_2O_2 до H_2O , тоді як GSH перетворюється на окиснений глутатіон (GSSG). GSSG згодом знову перетворюється на GSH за допомогою протонів, що надаються NADPH, під дією глутатіонредуктази. Неферментативні антиоксиданти в основному включають вітамін С, вітамін Е, β -каротин, каротиноїди, селен, цинк, таурин і GSH, які відіграють важливу роль у гомеостазі активних форм кисню *in vivo* [16].

Останніми роками приділяють багато уваги речовинам рослинного походження (поліфеноли як антиоксиданти). Відомо, що флавонол кверцетин має антиоксидантну, антиішемічну, мембрано-стабілізуювальну й імуномодулювальну дію. Кверцетин є антиоксидантом, який ефективно регулює енергетичний обмін у міокарді, знижує його потребу в кисні, стабілізує цитоплазматичні мембрани та спричиняє антиаритмічні й анаболічні ефекти. Препарат здатний знижувати концентрацію виділення вільних радикалів і токсичних продуктів пероксидного окиснення [12].

Поліфеноли вважають ефективними протиалергічними засобами, здатними впливати на множину біологічних шляхів і функцій імунних клітин під час алергічної імунної відповіді. Серед найбільш досліджуваних поліфенольних сполук рослинного походження (флавоноїдів) є кверцетин, який має сильний вплив на клітинний і гуморальний імунітет. Взаємодія поліфенолів із протеїнами може модулювати процес алергічної сенсibiлізації та їхній прямий вплив на алергічні ефекторні клітини, такі як тканинні базофіли, пригнічуючи вивільнення медіатора, що забезпечує полегшення симптомів. Поліфеноли, зокрема, флавоноїди, пригнічують вивільнення гістаміну з базофілів людини і тканинних базофілів миші. Флавоноїди також пригнічують вивільнення хімічних медіаторів; додатково знижують синтез інтерлейкінів (IL)-4 та IL-13 (цитокінів типу Th2), стимульованих алергеном

або антитілами до IgE клітин, що експресують рецептори (наприклад, базофіли периферичної крові або тканинні базофіли). Вони також можуть впливати на диференціювання глікопротеїну CD4 (кластер диференціації 4) Т-клітин (лейкоцитів) через інгібуючий вплив на активацію арил вуглеводного рецептора. Інгібіторна активність флавоноїдів на експресію ліганду IL-4 і CD40, ймовірно, пов'язана з їхньою інгібіторною дією на активацію ядерних факторів активованих Т-клітин і AP-1 (білок-активатор-1) [9, 15, 23].

Флавоноли, отримані з рослин, пригнічують вивільнення гістаміну та деяких цитокінів із базофілів і тканинних базофілів гризунів. Базофіли крові більшою мірою відповідають за баланс наявності гістаміну на певному рівні у крові, ніж тканинні базофіли. Флавоноли можна розглядати як потужні природні речовини для лікування алергії. На сьогодні увагу приділяють імуномодуючим і протизапальним властивостям кверцетину, таким як стимуляція імунної системи, протівірусна активність (щодо вірусу герпесу типу I), інгібування вивільнення гістаміну, інгібування активації ядерного фактора (NF-κB), прозапальних цитокінів і лейкотрієнів. Кверцетин індукуює значну експресію генів і вироблення інтерферону (IFN)-γ, що продукується Th-1 клітинами, а також пригнічення продукції IL-4, що стимулює перетворення Т-хелперів (Th0) на Th-2 клітини. Протизапальна дія кверцетину зумовлена пригніченням ферментів, таких як ліпоксигенази, й інгібуванням медіаторів запалення. Кверцетин впливає на імунітет і на процес запалення, діючи головно на лейкоцити й націлюючись на багато внутрішньоклітинних сигнальних кіназ і фосфатаз, ферменти, мембранні білки, часто важливі для клітинної специфічної функції. Кверцетин пригнічує вироблення та вивільнення гістаміну й інших алергічних і запальних речовин, можливо, шляхом стабілізації клітинних мембран тканинних базофілів. Зокрема, кверцетин є інгібітором алергічного (IgE-опосередкованого) вивільнення медіатора з тканинних базофілів і базофілів крові, іншого типу лейкоцитів, які беруть участь в імунних реакціях. Кверцетин також є інгібітором тканинних базофілів людини, які активуються через пригнічення надходження Ca²⁺, вивільнення гістаміну, лейкотрієнів та простагландинів і активацію протеїнкінази. Тканинні базофіли є важливими імунними клітинами для патогенезу алергічних реакцій і аутоімунних захворювань. Вони також здійснюють свій ефект через залучення у запальні реакції таких цитокінів як IL-8 і фактор некрозу пухлин (TNF). Це є причиною придатності кверцетину для лікування алергічних запальних захворювань, спричинених тканинними базофілами, таких як астма, синусит і ревматоїдний артрит [15].

Сучасні наукові дані свідчать, що хворі на рак, які приймали антигістамінні препарати під час імунотерапії, значно покращували виживаність. Виявлено, що кількість гістаміну і H1 рецепторів до гістаміну часто збільшується в мікрооточенні пухлини. Крім цього, вони індукують дисфункцію Т-клітин. Алергія через H1-рецептор-гістамін-опосередкований шлях сприяла росту пухлини та спричиняла резистентність до імунотерапії у мишей і людей. Важливо, що хворі на рак із низьким рівнем гістаміну у плазмі крові мали більш ніж утричі більшу об'єктивну відповідь на лікування анти-PD-1, порівняно з пацієнтами з високим рівнем гістаміну у плазмі [13].

Гістамін [2-(4-імідазоліл)-етиламін] входить до групи біогенних амінів [22]. Ключовим ферментом, відповідальним за розпад гістаміну, є діаміноксидаза. Накопичення гістаміну у плазмі може впливати на численні органи і тканини завдяки дії на чотири гістамінові рецептори, унаслідок чого виникає безліч симптомів, зокрема, й шлунково-кишкових, і позакишкових (тобто дерматологічні, респіраторні, неврологічні та гемодинамічні скарги). Дефіцит діаміноксидази може мати генетичне походження та пов'язаний із одонуклеотидними поліморфізмами, що кодують білок зі зниженою здатністю до деградації гіста-

міну. З іншого боку, порушення активності діаміноксидази також може бути тимчасовим і оборотним, виникає як побічна дія деяких широко застосовуваних фармакологічних препаратів (наприклад, квалуланової кислоти або ацетил цистеїну) або вторинним симптомом розладів, зокрема, і шлунково-кишкових [21].

Отже, гістамін спричиняє різні патологічні стани, включаючи і порушення прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу, кверцетин виступає антиоксидантним чинником, який мав би регулювати вільнорадикальні процеси в організмі, а також знижувати вивільнення гістаміну й інших біологічно активних сполук тканинними базофілами та базофілами крові. Важливо вивчити поєднаний вплив гістаміну та кверцетину різних концентрацій і виявити подібність змін показників прооксидантно-антиоксидантного стану крові за різних комбінацій концентрацій зазначених чинників і встановити характер впливу гістаміну й кверцетину на вільнорадикальні процеси, застосовуючи кластерний та факторний аналізи.

Мета: вивчити закономірності впливу гістаміну і кверцетину на показники прооксидантно-антиоксидантного стану плазми крові щурів за допомогою кластерного та факторного аналізів.

Матеріали та методи

У досліджах використовували цільну кров безпородних білих щурів-самців масою тіла 180–200 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. До цільної крові додавали кверцетин, щоби остаточні концентрації становили 0,1; 0,3; 0,5; 1; 3; 5 мМ. Слід зазначити, що концентрації кверцетину 1 та 3 мМ є терапевтичними дозами цієї речовини у фармацевтичних препаратах («Quercetin», «Квертин»). Кверцетин розчиняли у теплому фізіологічному розчині (37 °С). У другій серії дослідів до крові додавали розчин гістаміну (0,01; 0,1; 1; 10 мкМ). Ці концентрації ми обрали, опираючись на літературні дані, в яких йдеться про ефекти посилення вивільнення активних форм кисню нейтрофілами. Розчини готували, використовуючи 0,9 % NaCl. У третьому випадку до цільної крові додавали гістамін (у концентраціях 0,01 і 10 мкМ) і кверцетин (у концентраціях 0,1; 0,5; 3; 5 мМ). Зокрема, поєднували мінімальну концентрацію гістаміну із зазначеними концентраціями кверцетину. Те саме стосується і максимальної концентрації гістаміну. Так, було сформовано ще вісім експериментальних груп. Для комбінованої дії препаратів було обрано концентрації гістаміну – 0,01 і 10 мкМ та кверцетину – 0,1; 0,5; 3 і 5 мМ. Як контроль ми використовували кров, до якої додавали 0,01 мл фізіологічного розчину. Інкубували 5 хв, після чого центрифугували за 3000 об/хв (1000 g) упродовж 10 хв для осадження еритроцитів. Для аналізу відбирали плазму крові. У відібраних зразках вивчали інтенсивність процесів пероксидного окиснення ліпідів за вмістом гідропероксидів ліпідів і ТБК-позитивних продуктів [2, 6], рівень оксидативної модифікації протеїнів за методом І. Ф. Мецишена [5], (який базується на тому, що кінцеві продукти вільнорадикального окиснення протеїнів можуть кількісно реагувати з 2,4-динітрофенілгідразином з утворенням 2,4-динітрофенілгідразонів, що мають характерний спектр поглинання; оптичну густину утворюваних динітрофенілгідразонів реєстрували за 370 та 430 нм проти контролю; альдегідо- і кетопохідні нейтрального характеру реєструються за 370 нм (карбонільні групи протеїнів нейтрального характеру), а основного характеру – за 430 нм (карбонільні групи протеїнів основного характеру), визначали вміст супероксидного аніон-радикала [3], АТФ [1]. Стан антиоксидантної системи вивчали за активністю супероксиддисмутази за методом В. А. Костюка [2], каталази за методом М. А. Королюка [4], вмістом відновленого глутатіону [8]. Концентрацію протеїну визначали за методом Лоурі [17].

За результатами дослідження обчислювали середні значення, похибку та ступені вірогідності різниці (р) між показниками з використанням програми «Excel-2010» для Windows. Для кластерного та факторного аналізу всі абсолютні значення перераховували у відносні показники (у відсотки, %) щодо контролю. Кластерний і факторний аналізи виконували, застосовували статистичну програму SPSS.

Результати і їхнє обговорення

Для визначення подібності впливу на показники прооксидантно-антиоксидантного стану у плазмі крові щурів за дії гістаміну, кверцетину і поєданого впливу цих речовин нами було застосовано кластерний аналіз. За кроками алгомеризації визначали число кластерів, тобто загальну кількість подібних експериментальних груп в експерименті щодо змін вивчених показників. Отже, для визначення кількості груп подібності ми віднімали від 18-ти (кількість досліджуваних груп) 5 (номер етапу, за якого коефіцієнт кроків агломерації змінився стрибкоподібно) (табл. 1). Отримали 13 кластерів.

Таблиця 1

Середні зв'язки (між експериментальними групами)

Етап	Кроки агломерації					
	Кластер об'єднаний з		Коефіцієнти	Етап першої появи кластера		Наступний етап
	Кластер 1	Кластер 2		Кластер 1	Кластер 2	
1	15	17	1,902	0	0	6
2	8	10	1,943	0	0	7
3	3	9	2,814	0	0	7
4	11	12	3,508	0	0	5
5	11	13	5,211	4	0	8
6	15	16	6,167	1	0	12
7	3	8	6,218	3	2	11
8	11	14	6,835	5	0	13
9	2	4	7,096	0	0	14
10	5	6	7,974	0	0	13
11	3	7	8,077	7	0	14
12	15	18	9,204	6	0	16
13	5	11	11,089	10	8	15
14	2	3	12,665	9	11	15
15	2	5	19,251	14	13	16
16	2	15	20,327	15	12	17
17	1	2	30,575	0	16	0

У табл. 2 представлено приналежність кожної експериментальної групи до відповідного кластера (групи подібності), який позначений цифрою. Встановлено, що програма об'єднала в один кластер групи, до крові яких додавали кверцетин у концентрації 0,5 мМ, а також тільки гістамін у концентрації 0,1 мкМ (3-й кластер). Одну групу подібності складає вплив гістаміну у концентрації 1 мкМ та незалежний вплив гістаміну в концентрації 0,01 мкМ (8-й кластер). Програма також об'єднала в один кластер поєдане введення до крові гістаміну в концентрації 10 мкМ та кверцетину в концентраціях 0,1; 0,5; 3 мМ (9-й кластер). Одну групу подібності за показниками ТБК-позитивних продуктів, гідропероксидів ліпідів, карбонільних груп протеїнів, супероксидного аніон-радикала, супероксиддисмутази, каталази, відновленого глутатіону, АТФ становлять групи з поєднаним вливанням гістаміну в концентрації 0,01 мкМ та кверцетину в концентрації 0,1 і 3 мМ (11-й кластер) (табл. 2).

Нами встановлено, що у 3-му кластері (до нього входять групи: кверцетин у концентрації 0,5 мМ, гістамін у концентрації 0,1 мкМ) відбувається зниження вмісту ТБК-позитивних продуктів, значне підвищення вмісту супероксидного аніон-радикала та

значне зниження активності каталази (табл. 3). У 8-му кластері (до одної групи подібності входять: гістамін у концентрації 1 мкМ, гістамін у концентрації 0,01 мкМ) виявлено зниження вмісту ТБК-позитивних продуктів, зростання вмісту гідропероксидів ліпідів, значне підвищення вмісту супероксидного аніон-радикала та зниження АТФ і активності каталази (табл. 3).

Таблиця 2

Приналежність експериментальних груп до кластерів

Спостереження	Кластери
1: Кверцетин, 0,1 мМ	1
2: Кверцетин, 0,3 мМ	2
3: Кверцетин, 0,5 мМ	3
4: Кверцетин, 1 мМ	4
5: Кверцетин, 3 мМ	5
6: Кверцетин, 5 мМ	6
7: Гістамін, 10 мкМ	7
8: Гістамін, 1 мкМ	8
9: Гістамін, 0,1 мкМ	3
10: Гістамін, 0,01 мкМ	8
11: Гістамін, 10 мкМ + Кверцетин, 0,1 мМ	9
12: Гістамін, 10 мкМ + Кверцетин, 0,5 мМ	9
13: Гістамін, 10 мкМ + Кверцетин, 3 мМ	9
14: Гістамін, 10 мкМ + Кверцетин, 5 мМ	10
15: Гістамін, 0,01 мкМ + Кверцетин, 0,1 мМ	11
16: Гістамін, 0,01 мкМ + Кверцетин, 0,5 мМ	12
17: Гістамін, 0,01 мкМ + Кверцетин, 3 мМ	11
18: Гістамін, 0,01 мкМ + Кверцетин, 5 мМ	13

У 9-му кластері (до нього входять групи з дією гістаміну в концентрації 10 мкМ, кверцетину в концентраціях 0,1; 0,5; 3 мМ) виявлено значне зростання вмісту супероксидного аніон-радикала, значне зниження активності каталази та зростання вмісту АТФ у плазмі крові щурів (табл. 3).

В 11-му кластері (поєднаний вилив гістаміну (0,01 мкМ) та кверцетину в концентрації 0,1 і 3 мМ) відбувається зниження вмісту вторинних продуктів ліпопероксидації (ТБК-позитивних продуктів), значне підвищення вмісту первинних продуктів пероксидного окиснення ліпідів, значне зростання вмісту супероксидного аніон-радикала, АТФ, значне зниження активності каталази, зниження вмісту відновленого глутатіону (табл. 3).

Нами встановлено, що такі досліджувані впливи, як: кверцетин у концентраціях 0,1; 0,3; 1; 3; 5 мМ, гістамін у концентрації 10 мкМ, поєднана дія гістаміну в концентрації 10 мкМ та кверцетину в концентрації 5 мМ, поєднаний вплив гістаміну в концентрації 0,01 мкМ та кверцетину в концентрації 0,5 мМ, поєднана дія гістаміну в концентрації 0,01 мкМ та кверцетину в концентрації 5 мМ зумовлюють оригінальний вплив на показники прооксидантно-антиоксидантного стану плазми крові щурів, про що свідчить виведення цих впливів у окремі незалежні кластери.

Отже, у 3-му, 8-му, 9-му, 11-му кластерах виявлено спільні зміни, зокрема, зниження вмісту ТБК-позитивних продуктів, підвищення вмісту гідропероксидів ліпідів, супероксидного аніон-радикала, значне зниження активності каталази. На фоні таких змін є індивідуальні особливості для кожного кластера: у 3-му кластері знижується вміст відновленого глутатіону, тоді як у 8-му кластері вміст відновленого глутатіону підвищується, проте знижується вміст АТФ. У 9-му кластері виявлено зниження вмісту карбонільних груп протеїнів нейтрального й основного характеру, а 11-й кластер характеризується зниженням вмісту карбонільних груп протеїнів основного характеру, відновленого глутатіону та підвищенням активності супероксиддисмутази.

Таблиця 3

Середні значення досліджуваних показників по кластерах

Середній зв'язок (між експериментальними групами)	ТБК-ПП	ГП	КГПн.х.	КГПо.х.	САР	СОД	КАТ	ВГ	АТФ
1 M±m, p	188,4±0	169,2±0	122,1±0	107,9±0	5622,6±0	132,7±0	102,6±0	66,5±0	208,6±0
N	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2 M±m, p	119,8±0	144,6±0	151,6±0	135,9±0	24371,6±0	156,8±0	16,1±0	61,5±0	502,0±0
N	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3 M±m, p	36,5	438,4	126,7	111,2	25923,0	100,4	7,7±3,5	62,1	205,3
n	±25,1	±295,3	±16,5*	±13,7*	±349,4***	±17,1		±0,8***	±33,3
4 M±m, p	126,9±0	200,0±0	194,4±0	169,6±0	28641,3±0	113,1±0	86,5±0	61,9±0	498,9±0
n	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5 M±m, p	167,7±0	169,2±0	87,1±0	22,9±0	34052,3±0	81,8±0	15,2±0	127,2±0	743,9±0
n	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6 M±m, p	97,9±0	303,1±0	73,1±0	39,6±0	37178,5±0	152,1±0	61,4±0	114,4±0	406,5±0
n	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7 M±m, p	70,8±0	569,2±0	199,8±0	121,1±0	38641,2±0	94,2±0	3,5±0	124,1±0	498,0±0
n	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8 M±m, p	52,9	905,3	144,4	124,5	20809,0	88,8	4,1±0,7	122,8	71,6
n	±9,5	±285,3	±17,1*	±13,3*	±693,1***	±19,4		±3,4	±10,8
9 M±m, p	74,6	1828,7	34,4	23,8	30151,3	90,3	1,2±0,9	133,1	539,7
n	±28,0	±106,7**	±6,8**	±5,5	±4438,2**	±2,2***		±5,2***	±132,7
10 M±m, p	69,1±0	1526,1±0	18,3±0	10,8±0	49280,2±0	79,4±0	0,9±0	97,7±0	498,8±0
n	1	1	1	1	1	1	1	1	1
11 M±m, p	76,3	2574,1	102,9	42,1	24282,6	225,7	0,8±0,4	72,2	1146,7
n	±1,5**	±248,1*	±1,1***	±1,2**	±5370,1	±1,6***		±6,8*	±87,3**
12 M±m, p	42,2±0	2194,9±0	118,5±0	79,9±0	32734,4±0	136,1±0	2,0±0	79,5±0	1045,0±0
n	1	1	1	1	1	1	1	1	1
13 M±m, p	46,1±0	2366,8±0	146,9±0	127,2±0	14574,8±0	177,2±0	1,8±0	67,4±0	507,9±0
n	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Примітка: ТБК-ПП – ТБК-позитивні продукти; ГП – гідропероксиди ліпідів; КГПн.х. – карбонільні групи протеїнів нейтрального характеру; КГПо.х. – карбонільні групи протеїнів основного характеру; САР – супероксидний аніон-радикал; СОД – супероксиддисмутаза; КАТ – каталаза; ВГ – відновлений глутатіон; АТФ – аденозинтрифосфорна кислота

3-й кластер об'єднує вплив кверцетину в концентрації 0,5 мМ та гістаміну в концентрації 0,01 мкМ. Подібні зміни за досліджуваними показниками прооксидантно-антиоксидантного стану відбуваються, ймовірно, в результаті певної подібності впливу цих чинників, який виражається у дії на судини (гіпотензивний вплив), бактерицидному ефекті, хоча механізми впливу є різними [14, 20]. 8-й кластер об'єднує вплив гістаміну різних концентрацій, а саме 0,01 і 1 мкМ, тоді як гістамін у концентраціях 0,1 і 10 мкМ виявляється у зовсім інших кластерах. Це відбувається тому, що на різних клітинах крові є домінація у чисельності різних рецепторів до гістаміну і, відповідно, різна концентрація гістаміну буде по-різному активувати гістамінові рецептори, які поділяються на гальмівні (H3 і H4) й активуючі (H1 і H2). Від переважання дії гістаміну на ті чи інші рецептори проявляється

різна відповідь клітин [7]. У 9-му кластері виявлено подібний вплив спільної дії гістаміну в концентрації 10 мкМ і кверцетину, який виражається у зниженні вмісту карбонільних груп протеїнів нейтрального й основного характеру. Це свідчить про те, що знижується негативна оксидативна дія гістаміну та кверцетину на протеїнові молекули. За незалежної дії гістаміну, попри активацію рецепторів до гістаміну, залучається в роботу і ферментативна система, спрямована на знищення гістаміну. До цієї системи належить робота гістамінази, гістамін-N-метилтрансферази, моноаміноксидази. Унаслідок роботи гістамінази утворюються шкідливі сполуки, такі як NH_3 , імідазолацетатальдегід, H_2O_2 [18, 22]. Гістамін також діє на активацію фосфоліпаз, які відщеплюють певні частини ліпідів (через H_1 рецептор), зумовлює ушкодження роботи моноаміноксидаз [19]. Кверцетин діє на АТФ-зв'язуючі сайти білків (АТФаз); кверцетин може переходити у радикальну форму; кверцетин може автоокиснюватись і продукувати супероксидний аніон-радикал, пероксид водню. Отже, за незалежної дії гістаміну і кверцетину можливі утворення шкідливих сполук, які спричиняють ушкодження клітин. Ймовірно, за наявності гістаміну та кверцетину в середовищі відбувається їхня взаємодія й утворюються метаболіти (імідазолілетилгідроксил, 7-дегідроксикверцетин), які знижують негативну незалежну дію цих сполук. Важливо зазначити, що в 11-му кластері (за поєднаної дії гістаміну в концентрації 0,01 мкМ і кверцетину) у плазмі крові відбувається зниження вмісту карбонільних груп протеїнів основного характеру, проте вміст карбонільних груп протеїнів нейтрального характеру перебуває в межах норми.

За допомогою факторного аналізу можна виявити приховані «фактори», які відповідають за наявність лінійних статистичних зв'язків (кореляцій) між досліджуваними показниками у досліджуваних групах. Для виявлення придатності факторного аналізу для опрацювання результатів дослідження нами проведено тест, який визначив міру вибіркової адекватності Кайзера-Майера-Олкіна. Значення адекватності Кайзера-Майера-Олкіна становить 0,5, що свідчить про придатність факторного аналізу для опрацювання результатів експерименту (табл. 4).

Таблиця 4

Показники адекватності факторного аналізу для опрацювання результатів дослідження

Критерій сферичності	Міра вибіркової адекватності Кайзера-Майера-Олкіна	0,5
Бартлетта	Наближ. Хі-квадрат	96,693
	Ст.св.	36
	Знч.	0,000

Критерій сферичності Бартлетта, за результатами експерименту, дорівнює 0,000 (тобто P менше 0,05), що свідчить також про можливість застосування факторного аналізу в комплексному біометричному аналізі (табл. 4).

За табл. 5 визначено кількість власних факторів, які перевищують одиницю (див. по колонці «Разом», яка базується на відсотку дисперсії). Кількість факторів становить 3 (табл. 5). У подальшому програма буде формувати лише три модельні фактори впливу.

У табл. 6 відображена матриця факторних навантажень, які є кореляційними коефіцієнтами між змінними і факторами. Отже, фактор I корелює найсильніше з карбонільними групами протеїнів основного характеру ($r = 0,917$), карбонільними групами протеїнів нейтрального характеру ($r = 0,88$), відновленим глутатионом ($r = -0,719$), супероксидним аніон-радикалом ($r = -0,584$). Фактор II найбільше корелює з АТФ ($r = 0,859$), супероксиддисмутазою ($r = 0,853$), гідропероксидами ліпідів ($r = 0,715$). Фактор III корелює з ТБК-позитивними продуктами ($r = 0,93$), каталазою ($r = 0,844$).

Таблиця 5

Повна пояснена дисперсія				
Компонента	Початкові власні значення			
	Разом	% дисперсії		Кумулятивний %
1	3,231	35,894		
2	2,292	25,461		
3	1,551	17,228		
4	0,819	9,103		87,687
5	0,480	5,335		93,022
6	0,275	3,052		96,074
7	0,210	2,335		98,409
8	0,123	1,367		99,776
9	0,020	0,224		100,000

Метод виділення: Аналіз головних компонент.

Фактор I можна пов'язати з дією на оксидативну модифікацію протеїнів, відновлений глутатіон і утворення супероксидного аніон-радикала (умовна назва цього фактора «фактор дії на білки»). Фактор II впливає на зміну вмісту АТФ, активність супероксиддисмутази й утворення первинних продуктів ліпопероксидації (гідропероксидів ліпідів) у плазмі крові (умовна назва фактора II «фактор дії на біоенергетику й ініціації процесів пероксидного окиснення ліпідів»). Фактор III впливає на накопичення вторинних продуктів ліпопероксидації (ТБК-позитивні продукти) й активність каталази (умовна назва фактора III «фактор посилення процесів пероксидного окиснення ліпідів»).

Фактор I характерний для груп за впливу кверцетину в концентраціях 0,3; 0,5 та 1 мМ (факторні значення становлять 1,01; 1,09; 1,31 відповідно), а також для групи за одночасної дії гістаміну в концентрації 0,01 мкМ і кверцетину в концентрації 5 мМ (табл. 7). Фактор I впливає на ушкодження протеїнів.

Таблиця 6

Матриця факторних навантажень (матриця повернутих компонент)

Змінні	Компонента			
	1	2	3	
Карбонільні групи протеїнів основного характеру	0,917	-0,344		-0,012
Карбонільні групи протеїнів нейтрального характеру	0,880	-0,180		-0,011
Відновлений глутатіон	-0,719	-0,401		-0,150
Супероксид-аніон радикал	-0,584	-0,140		-0,258
АТФ	-0,211	0,859		-0,063
Супероксиддисмутаза	0,369	0,853		0,056
Гідропероксили ліпідів	-0,249	0,715		-0,502
ТБК-позитивні продукти	-0,089	-0,002		0,930
Каталаза	0,306	-0,140		0,844

Метод виділення: Аналіз методом головних компонент.

Метод обертання: Варімакс із нормалізацією Кайзера.

а. Обертання зійшлося за 5 ітерацій.

Фактор II характерний для групи за одночасного впливу гістаміну в концентрації 0,01 мкМ та кверцетину в концентрації 0,1 мМ та 3 мМ. Фактор II пов'язаний з енергетичним станом і утворенням первинних продуктів пероксидного окиснення ліпідів.

Фактор III характерний для груп за впливу кверцетину різних концентрацій (0,1; 1; 3; 5 мМ). Фактор III впливає на утворення вторинних продуктів ліпопероксидації та механізм знешкодження пероксиду водню.

Отже, кверцетин спричиняє активацію фактора I (впливу на протеїни, зумовлюючи

Таблиця 7

Результати експериментальних показників (виражені у відсотках) і факторні значення

	ТБК- ПП	ГП	КГП н.х.	КГП о.х.	САР	СОД	КАТ	ВГ	АТФ	Фак- тор I	Фак- тор II	Фак- тор III
Кверцетин 0,1 мМ	188,47	169,23	122,07	107,97	5622,69	132,78	102,69	66,51	208,69	0,81	-0,06	2,69
Кверцетин 0,3 мМ	119,90	144,62	151,64	135,99	24371,66	156,89	16,14	61,55	502,01	1,01	0,05	0,50
Кверцетин 0,5 мМ	11,40	143,08	143,27	125,00	26272,43	117,52	11,21	62,90	171,96	1,09	-0,79	-0,89
Кверцетин 1 мМ	126,99	200,00	194,41	169,62	28641,34	113,19	86,55	61,92	498,94	1,31	-0,44	1,26
Кверцетин 3 мМ	167,72	169,23	87,19	22,93	34052,34	81,82	15,25	127,23	743,98	-1,30	-0,33	1,23
Кверцетин 5 мМ	97,91	303,08	73,14	39,70	37178,53	152,07	61,43	114,46	406,52	-0,72	-0,16	1,05
Гістамін 10 мкМ	70,88	569,23	199,81	121,05	38641,27	94,21	3,55	124,10	498,04	0,33	-0,98	-0,69
Гістамін 1 мкМ	43,39	620,00	127,46	111,21	20115,96	69,42	4,89	126,26	60,81	0,24	-1,42	-0,76
Гістамін 0,01 мкМ	61,77	733,85	110,13	97,41	25573,61	83,37	4,19	61,26	238,65	0,45	-0,61	-0,42
Гістамін 0,01 мкМ	62,43	1190,77	161,48	137,91	21502,13	108,37	3,41	119,42	82,52	0,70	-0,97	-0,77
Гіст. 10 мкМ +Кверц.0,1 мМ	57,61	1920,22	27,49	18,61	24062,37	89,43	3,05	123,08	788,37	-1,19	0,32	-0,31
Гіст. 10 мкМ +Кверц.0,5 мМ	36,90	1950,13	48,15	35,06	38789,26	94,63	0,19	135,75	496,31	-1,22	-0,28	-0,88
Гіст. 10 мкМ +Кверц.3 мМ	129,36	1615,85	27,75	18,00	27602,32	87,06	0,56	140,57	334,57	-1,54	-0,32	0,40
Гіст. 10 мкМ +Кверц.5 мМ	69,17	1526,15	18,31	10,87	49280,24	79,47	0,93	97,73	498,86	-1,57	-0,21	-0,35
Гіст. 0,01 мкМ +Кверц.0,1 мМ	77,85	2326,09	104,12	43,38	29652,72	227,38	1,35	65,34	1234,07	0,09	2,24	-0,13
Гіст. 0,01 мкМ +Кверц.0,5 мМ	42,28	2194,92	118,56	79,90	32734,45	136,07	2,02	79,52	1045,04	0,11	0,96	-0,83
Гіст. 0,01 мкМ +Кверц.3 мМ	74,75	2822,10	101,86	40,91	18912,51	224,16	0,37	79,09	1059,35	0,16	2,18	-0,23
Гіст. 0,01 мкМ +Кверц.5 мМ	46,06	2366,86	146,92	127,30	14574,87	177,21	1,87	67,40	507,91	1,26	0,83	-0,87

Примітка: ТБК-ПП – ТБК-позитивні продукти; ГП – гідропероксиди ліпідів; КГПн.х. – карбонільні групи протеїнів нейтрального характеру; КГПо.х. – карбонільні групи протеїнів основного характеру; САР – супероксидний аніон-радикал; СОД – супероксиддисмутаза; КАТ – каталаза; ВГ – відновлений глутатіон; АТФ – аденозинтрифосфорна кислота

їхнє окиснення) та фактора III (зокрема, посилення процесів пероксидного окиснення ліпідів) залежно від концентрації препарату. Важливо відзначити, що кверцетинові в концентрації 1 мМ належить властивість обох факторів (I і III). Кверцетин у концентрації 1 мМ є терапевтичною разовою мінімальною дозою. Проте ми в наших дослідженнях, застосовуючи факторний аналіз, виявили її негативний ефект на протеїни і ліпіди плазми крові.

Поєднане введення гістаміну в концентрації 0,01 мкМ та кверцетину в концентраціях 0,1 та 3 мМ активує фактор II у крові щурів, де у плазмі виявляють підвищення вмісту АТФ, зростання активності ферменту супероксиддисмутази та підвищення вмісту гідропероксидів ліпідів. Відомо, що під час гіпоксичних станів АТФ виступає ендogenousним

внутрішньоклітинним і міжклітинним регулятором функцій клітини. Зокрема, вона впливає на шлях передачі рецепторного сигналу і модифікує метаболізм клітини.

Отже, за результатами кластерного аналізу всі досліджувані групи формують 13 кластерів подібності за показниками вільнорадикальних процесів і АТФ. Подібну дію на досліджувані показники плазми крові чинить гістамін у концентраціях 0,01 і 1 мкМ, а також одночасний вплив гістаміну в концентрації 10 мкМ та кверцетину в концентраціях 0,1; 0,5; 3 мМ. Подібний ефект на показники прооксидантно-антиоксидантного стану чинить сумісна дія гістаміну в концентрації 0,01 мкМ та кверцетину в концентрації 0,1 і 3 мМ. Факторний аналіз дав змогу виявити три приховані фактори впливу на показники прооксидантно-антиоксидантного стану, АТФ: фактор дії на протеїни, фактор впливу на біоенергетику й ініціатор процесів пероксидного окиснення ліпідів, фактор посилення процесів пероксидного окиснення ліпідів. Кверцетин активує фактор I (впливу на протеїни) та фактор III (посилення процесів пероксидного окиснення ліпідів). Одночасне додавання гістаміну в концентрації 0,01 мкМ та кверцетину в концентраціях 0,1 та 3 мМ активують фактор II (вплив на біоенергетику) у плазмі крові щурів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Воронкова Ю. С.* Біохімічні характеристики еритроцитів щурів пухлиноносіїв за введення цисплатину та кластерних сполук ренію: дис. ... канд. біол. наук: 03.00.04. Дніпропетровськ, 2015. 161 с.
2. *Гарасим Н. П., Бура М. В., Боднарчук Н. О.* Великий практикум з біофізики. Лабораторний практикум: навч.-метод. посіб. для здобувачів вищої освіти за спеціальністю 091 – Біологія. Львів: ЛНУ ім. І. Франка, 2023. 200 с.
3. *Денисенко С. В., Костенко В. А.* Изменения продукции активных форм кислорода в семенниках белых крыс в условиях хронической интоксикации нитратом натрия // *Сучасні проблеми токсикології*. 2005. № 4. С. 44–46.
4. *Єфіменко Н. В.* NO-залежна регуляція морфофункціонального стану тромбоцитів та еритроцитів крові за умов алкогольної інтоксикації: дис. ... д-ра філософії (канд. біол. наук): 03.00.04. Львів, 2017. 193 с.
5. *Мецишен І. Ф.* Метод визначення окиснювальної модифікації білків плазми (сироватки) крові // *Буковин. мед. вісн.* 1998. Т. 2. № 1. С. 156–158.
6. *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.
7. *Радченко О. М.* Гістамін як життєво важливий універсальний регулятор // *Раціональна фармакотерапія*. 2017. № 4 (45). С. 5–9.
8. *Сибірна Н. О., Маєвська О. М., Барська М. Л.* Дослідження окремих біохімічних показників за умов оксидативного стресу. Львів: Вид. центр ЛНУ ім. І. Франка, 2006. 60 с.
9. *Amalia Di Petrillo, Germano Orrù, Antonella Fais, Massimo C. Fantini.* Quercetin and its derivatives as antiviral potentials: A comprehensive review // *Phytother. Res.* 2022. Vol. 36 (1). P. 266–278. doi: 10.1002/ptr.7309.
10. *Atze van der Pol, Wiek H. van Gilst, Adriaan A. Voors, Peter van der Meer.* Treating oxidative stress in heart failure: past, present and future // *Eur. J. Heart Fail.* 2019. Vol. 21. P. 425–435. doi:10.1002/ejhf.1320
11. *Carracedo J., Ramirez-Carracedo R., Martínez de Toda I. et al.* Protein Carbamylation: A Marker Reflecting Increased Age-Related Cell Oxidation // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. Vol. 19. P. 1495. doi:10.3390/ijms19051495. <https://doi.org/10.3390/ijms19051495>

12. *Demkovych A.* Effects of flavonol quercetin on activity of lipid peroxide oxidation in experimental bacterial-immune periodontitis // *Interv. Med. Appl. Sci.* 2019. Vol. 11 (1). P. 55–59. doi: 10.1556/1646.10.2018.48
13. *Hongzhong Li., Yi Xiao, Qin Li.* et al. The allergy mediator histamine confers resistance to immunotherapy in cancer patients via activation of the macrophage histamine receptor H1 // *Cancer Cell.* 2022. Vol. 40 (1). P. 36–52. doi: 10.1016/j.ccell.2021.11.002. Epub 2021 Nov 24.
14. *Jinbong Park* Anti-Anaphylactic Activity of Isoquercitrin (Quercetin-3-O- β -d-Glucose) in the Cardiovascular System of Animals // *Biomedicines.* 2020. Vol. 8. P. 139. doi:10.3390/biomedicines8060139
15. *Jiri Mlcek, Tunde Jurikova, Sona Skrovankova, Jiri Sochor.* Quercetin and Its Anti-Allergic Immune Response // *Molecules.* 2016. Vol. 21. P. 623. doi:10.3390/molecules21050623
16. *Junzhi Liang, Yingzhuo Gao, Ziyi Feng.* et al. Reactive oxygen species and ovarian diseases: Antioxidant strategies // *Redox Biology.* 2023. Vol. 62. P. 102659 <https://doi.org/10.1016/j.redox.2023.102659>
17. *Lowry O. H.* Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* 1951. Vol. 193 (1). P. 404–415.
18. *Oriol Comas-Basté, Sònia Sánchez-Pérez, Maria Teresa Veciana-Nogués* et al. Histamine Intolerance: The Current State of the Art // *Biomolecules.* 2020. Vol. 10. P. 1181. doi:10.3390/biom10081181.
19. *Rui-Qi Xu, Ling Ma, Timson Chen* et al. Sophorolipid inhibits histamine-induced itch by decreasing PLC/IP3R signaling pathway activation and modulating TRPV1 activity // *Sci. Rep.* 2023. Vol. 13 (1). P. 7957. doi: 10.1038/s41598-023-35158-9.
20. *Shangze Gao, Keyue Liu, Wenhan Ku* et al. Histamine induced high mobility group box-1 release from vascular endothelial cells through H₁ receptor // *Front Immunol.* 2022. Vol. 5 (13). P. 930683. doi: 10.3389/fimmu.2022.930683.
21. *Sònia Sánchez-Pérez, Oriol Comas-Basté, Adriana Duelo* et al. Intestinal Dysbiosis in Patients with Histamine Intolerance // *Nutrients.* 2022. Vol. 14. P. 1774. <https://doi.org/10.3390/nu14091774>
22. *Wolfgang J. Schnedl, Dietmar Enko.* Histamine Intolerance Originates in the Gut // *Nutrients.* 2021. Vol. 13. P. 1262. <https://doi.org/10.3390/nu13041262>
23. *Yao Li, Jiaying Yao, Chunyan Han* et al. Quercetin, Inflammation and Immunity // *Nutrients.* 2016. Vol. 8. P. 167. doi:10.3390/nu8030167.

Стаття надійшла до редакції 13.05.24

доопрацьована 28.06.24

прийнята до друку 01.07.24

**BIOMETRIC ANALYSIS OF INDICATORS OF PROXYDANT AND
ANTIOXIDANT STATUS OF BLOOD PLASMA OF RATS
UNDER THE EFFECT OF HISTAMINE AND QUERCETIN****N. Harasym¹, N. Toyliiev¹, N. Bodnarchuk¹, A. Zyn²***¹Ivan Franko National University of Lviv
4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine**²Lviv Research Forensic Center of the Ministry of Internal Affairs of Ukraine
24, Konyushinna St., Lviv 79040, Ukraine**e-mail: garasymnataly@gmail.com; nataliya.harasym@lnu.edu.ua*

The regularities of the effect of histamine in concentrations of 0.01; 0.1; 1; 10 μM were studied and quercetin in concentrations of 0.1; 0.3; 0.5; 1; 3; 5 mM, as well as their combined effect on the prooxidant-antioxidant state of blood plasma of rats, using cluster and factor biometric analyses. It was established that the experimental groups according to the investigated indicators (TBA-positive products, lipid hydroperoxides, carbonyl groups of neutral and basic proteins, superoxide anion radical, superoxide dismutase, catalase, reduced glutathione, ATP) were distributed among 13 clusters (according to cluster analysis). In one group of similarities, the effect of histamine in concentrations of 0.01 μM and 1 μM was revealed. Quercetin at a concentration of 0.5 mM and histamine at a concentration of 0.1 μM have a similar effect on the indicators of the prooxidant-antioxidant state of the blood plasma. Combined addition to the blood of histamine at a concentration of 10 μM and quercetin at a concentration of 0.1; 0.5; 3 mM lead to the same changes in the indicated studied indicators. Cluster analysis also combined the combined effects of 0.01 μM histamine and 0.1 and 3 mM quercetin. It is important to note that a decrease in the content of carbonyl groups of proteins was found in those classes whose experimental blood groups were added to histamine and quercetin, which indicates a decrease in protein damage due to free radical oxidation processes. Using factor analysis, it was established the presence of three hidden factors that affect the processes of free radical oxidation of blood under the action of histamine and quercetin. A high correlation of factor I with protein carbonyl groups, reduced glutathione, superoxide anion radical was revealed. Factor II is most correlated with ATP, superoxide dismutase, lipid hydroperoxides. There is a close relationship between factor III and TBA-positive products and catalase. Taking into account the closeness of the relationship, factor I was given the name "factor of action on proteins", factor II – "factor of action on bioenergetics and initiator of lipid peroxidation processes", factor III – "factor of enhancement of lipid peroxidation processes". It was established that quercetin activates factor I (influence on proteins, causing their oxidation) and factor III (intensification of lipid peroxidation processes) depending on the concentration of the drug. Quercetin in a concentration of 1 mM has the property of both factors (I and III).

Keywords: blood plasma, histamine, prooxidant-antioxidant status, quercetin, cluster analysis, factor analysis