

чена способность L-аргинина ограничивать гиперпродукцию $\cdot O_2^-$ микросомальной и митохондриальной электронно-транспортными цепями. Применение сквенджера пероксинитрита (L-селенометионина) ограничивает гиперпродукцию $\cdot O_2^-$ митохондриями (при 6 - и 18 часовой кишечной непроходимости) и увеличивает выработку $\cdot O_2^-$ НАДФН-оксидазой лейкоцитов (при 6 - часовой непроходимости).

Summary

NO-DEPENDENT CHANGES IN SUPEROXIDE ANION-RADICAL PRODUCTION IN THE SMALL INTESTINE UNDER CONDITIONS OF ITS ACUTE OBSTRUCTION

Levkov A.A., Kostenko, V.A.

Key words: acute intestinal obstruction, superoxide anion-radical, nitric oxide, NO-synthase, peroxyxynitrite.

Superoxide anion-radical production ($\cdot O_2^-$) in small intestine under its acute obstruction and NO-synthase functional activity changes have been studied in experiment on 70 white rats. We have found the use of non-selective NO-synthases inhibitor (NG-nitro-L-arginine methyl ester, L-NAME), selective inhibitors of inducible (aminoguanidine) and neuronal (7-nitronidazole) NOS prevents excessive increase in production $\cdot O_2^-$ by microsomes.

The use of a selective inhibitor of iNOS prevents increasing in $\cdot O_2^-$ generation by mitochondrial respiratory chain. Application of L-NAME increases $\cdot O_2^-$ production for 6-hour obstruction, which indicates the role of the constitutional NOS in the prevention $\cdot O_2^-$ mitochondrial overproduction at given period. At the late period of obstruction (18 hours) $\cdot O_2^-$ mitochondrial hyperproduction associated with the action both inducible and neuronal NOS. Application of nonselective inhibitor NOS, iNOS and nNOS selective inhibitors restricts $\cdot O_2^-$ mitochondrial overproduction. We have found L-arginine limits $\cdot O_2^-$ overproduction by both microsomal and mitochondrial electron transport chain. Peroxyxynitrite scavenger (L-selenomethionine) administration limits $\cdot O_2^-$ mitochondrial hyperproduction (under 6th- and 18th-hour intestinal obstruction), and increases $\cdot O_2^-$ production by NADPH oxidase of leukocytes (under 6th- hour occlusion).

УДК: 616.5–001.28/.29–085.275–085.454.1–092.9

МЕМБРАНОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ МАЗИ ТИОТРИАЗОЛИНА ПРИ ДЕЙСТВИИ НА КОЖУ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Звягинцева Т.В., Миронченко С.И., Нардид О.А., Желнин Е.В.

Харьковский национальный медицинский университет, Харьков, Украина

Изучено влияние мази тиотриазолина на барьерные функции клеточных мембран кожи с помощью метода электронного парамагнитного резонанса при локальном ионизирующем облучении. Методом электронного парамагнитного резонанса подтвержден мембраноповреждающий эффект ионизирующего излучения. У облученных животных выявлены нарушения проницаемости клеточных мембран кожи, проявляющиеся резким уменьшением интенсивности и уширением спектра электронного парамагнитного резонанса. Мазь тиотриазолина при действии на кожу ионизирующего излучения оказывала мембранопротекторное действие. Характер изменения спектров электронного парамагнитного резонанса при применении мази тиотриазолина свидетельствовал об отсутствии повреждающего действия облучения на барьерные свойства клеточных мембран.

Ключевые слова: кожа, ионизирующее излучение, электронный парамагнитный резонанс, тиотриазолин

При лучевой терапии онкологических больных, работе с ионизирующими источниками, угрозе лучевых поражений во время техногенных аварий кожные покровы обязательно подвергаются воздействию ионизирующего излучения, что может приводить к развитию местных лучевых повреждений [1-3].

Ранние лучевые повреждения кожи, развивающиеся после однократного воздействия ионизирующего излучения, внешне схожи с ожогами, но отличаются от них преобладанием симптомов, обусловленных альтерацией и гибелью тканей; поздним развитием отграничения поражения и восстановления тканей, частым замед-

* Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами – відповідно до планів науково-дослідних робіт Харківського національного медичного університету МОЗ України «Дослідження шляхів фармакологічної корекції несприятливих наслідків стресу» (№ державної реєстрації 0103U004548); «Створення, дослідження та патогенетичне обґрунтування застосування нових комбінованих лікарських засобів та лікарських засобів політропної дії» (№ державної реєстрації 0109U001748).

лением репаративных процессов [4,5]. Критическими структурами, лучевые повреждения которых могут быть ответственными за летальный исход при воздействии ионизирующего излучения, являются биологические мембраны [6,7]. Свободные радикалы инициируют лавинообразно нарастающие реакции перекисного окисления липидов, входящих в состав клеточных мембран. В результате этих процессов клеточные мембраны претерпевают структурно-функциональные изменения, приводящие к нарушению их барьерно-транспортной функции [8,9].

Электронный парамагнитный резонанс (ЭПР) является методом, с помощью которого исследуют структурно-динамические свойства биомембран и макромолекул. Метод ЭПР с помощью спиновых зондов позволяет исследовать барьерную функцию биомембран, проницаемых для гидрофильных спиновых зондов и, напротив, замкнутых для ряда парамагнитных ионов. Последние применяются в методическом подходе "добавочное уширение", позволяющем "проявлять" сигнал ЭПР исключительно внутриклеточных спиновых зондов [10, 11].

Для защиты кожных покровов с профилактической и лечебной целью применяют радиопротекторы, способные предотвращать переокисление липидов, поглощать свободные радикалы и стабилизировать клеточные мембраны [12, 13]. Поэтому актуальным направлением современной радиомедицины является поиск противолучевых препаратов, обладающих антиоксидательными свойствами. Отечественный препарат «Мазь тиотриазолина 2%» обладает мембраностабилизирующими свойствами, тормозит процессы свободнорадикального окисления липидов и активирует ферменты антирадикальной защиты в поврежденных тканях кожи и слизистых оболочках, что ведет к укорочению стадии травматического воспаления, ускорению репаративных процессов [14, 15]. Данные об антиоксидантных свойствах мази тиотриазолина получены и в наших исследованиях [16], однако прямых доказательств защиты биомембран под влиянием мази тиотриазолина нет.

Целью исследования явилось изучение барьерных свойств кожи с помощью метода электронного парамагнитного резонанса и мембранопротекторного действия мази тиотриазолина при локальном ионизирующем облучении.

Материалы и методы

Исследования проводили на 18 морских свинках массой 450-600 г, распределенных на 3 группы: 1 группа – интактные животные; 2 группа – животные, подвергшиеся локальному ионизирующему излучению, без лечения (контроль); 3 группа – облученные животные, которым наносили мазь тиотриазолина в лечебно-профилактическом режиме. Морских свинок по-

двергали однократному локальному рентгеновскому облучению в области бедра в дозе 80 Гр (облучатель TUR-60, 5 мА, 50 кВ, фильтр 0,3 мм Al, мощность дозы 80,2 Гр/мин) [17]. Мазь тиотриазолина наносили тонким слоем на облученную поверхность кожи за 1 час до облучения и ежедневно в течение 3 дней после облучения. На 3-и сутки после облучения проводили исследования барьерных свойств клеточных мембран кожи с помощью метода ЭПР, используя гидрофильный спиновой зонд ТЕМПОН (2,2,6,6-тетраметил-4-оксопиперидин-1-оксил) в комбинации с феррицианидом калия (ФЦК) [18]. Исходные концентрации солей, соответственно, 10^{-2} М и 1 М. Среда инкубирования образцов кожи содержала водный раствор зонда (10^{-4} М) и 10^{-2} М ФЦК. Эмпирически подобраны навески образцов, позволяющие получать спектры ЭПР с воспроизводимой интенсивностью. Эмпирически подобранные концентрации спинового зонда и уширяющих агентов позволяют проявлять сигнал ЭПР исключительно от зондов, находящихся в клетке. Спектры ЭПР регистрировали на спектрометре "Bruker" (Германия) при температуре 20°C. Амплитуда модуляции сигнала 1 Г, ток диода 200 мкА, постоянная времени 1 мсек, время записи спектра 100 сек [11].

Спектр ЭПР гидрофильного зонда 2,2,6,6-тетраметил-4-оксопиперидин-1-оксил (ТЕМПОН) в физиологической среде, содержащей суспензию клеток или образцы ткани, представляет собой триплет, свидетельствующий о быстром вращении нитроксильных радикалов в воде. Вследствие того, что молекулы зонда легко проникают через плазматические мембраны, регистрируется усредненный спектр от всех зондов, находящихся вне и внутри клеток. Если в среду добавить парамагнитную соль (например, феррицианид калия), происходит динамическое уширение сигнала внеклеточных зондов вследствие непроникновения ионов феррицианида калия через мембраны. В норме полученный спектр будет обусловлен зондами, не доступными ионам феррицианида калия, что характеризует барьерные свойства биомембран. В случае нарушения целостности мембран при действии физико-химических факторов увеличение доступности внутриклеточных зондов для ионов феррицианида калия приведет к изменению вида спектра, что определенным образом будет зависеть от степени нарушения барьерных свойств [11, 18].

Результаты исследования

Анализ спектров, полученных при исследовании образцов кожи интактных морских свинок, показал, что наблюдается вариабельность соотношения интенсивностей, обусловленная, по-видимому, структурой выбранного случайным образом образца кожи (рис. 1).

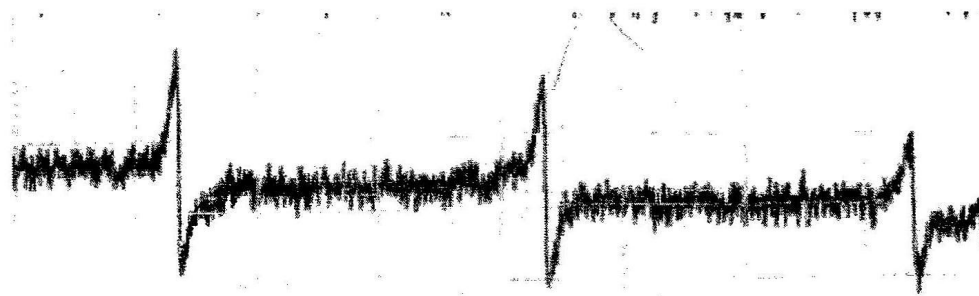


Рис. 1. Сигналы ЭПР спицевого зонда кожи интактной морской свинки

В группе контроля зарегистрировано резкое уменьшение интенсивности и уширение спектра, что характеризует нарушение проницаемости клеточной мембраны в глубоких слоях кожи (рис. 2).

Параметры остаточного сигнала свидетельствовали об увеличении доступности зонда для ионов ушряющего агента в обоих микроокружениях. В ряде случаев в результате облучения

отмечено увеличение доли «гидрофобного» сигнала, что указывает на увеличение проникновения молекул ТЕМПОН в межслойные микрообласти (рис. 2). Наблюдаемые различия в эффектах облучения обусловлены, по-видимому, различиями в структуре (толщине) исследуемых образцов кожи.

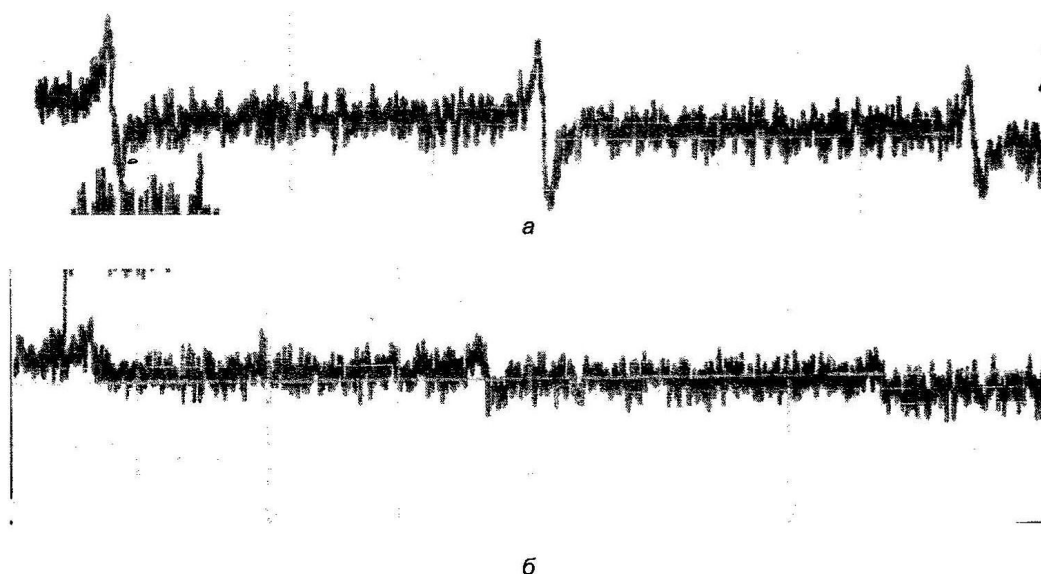


Рис. 2. Сигналы ЭПР спицевого зонда кожи морской свинки на 3-и сутки после локального ионизирующего облучения: а – необлученный участок кожи; б – облученный участок кожи

Облучение кожи при профилактическом применении мази тиотриазолина сопровождалось различными изменениями спектров ЭПР. Возможно, применение мази вносило свой вклад в изменение доступности различных слоев кожи для молекул зонда до облучения. Трансформация спектров в результате облучения обуслов-

лена изменением распределения молекул ТЕМПОН между различными микрообластями. Ни в одном из случаев не было обнаружено существенного увеличения доступности глубоких областей кожи для ионов феррицианида калия в отличие от контроля (рис. 3).

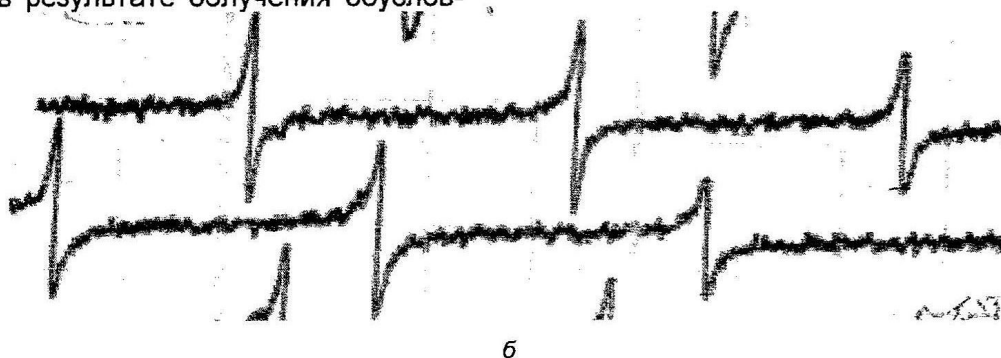


Рис. 3. Сигналы ЭПР спицевого зонда кожи морской свинки на 3-и сутки после локального ионизирующего облучения с применением мази тиотриазолина: а – необлученный участок кожи; б – облученный участок кожи

Таким образом, с помощью метода электронного парамагнитного резонанса получены данные, подтверждающие мембраноповреждающий эффект ионизирующего излучения, связанный с интенсификацией процессов пероксидации, а также прямые доказательства способности мази тиотриазолина уменьшать доступность кожи к повреждающему лучевому воздействию и способствовать протекции плазматических мембран.

Выводы

1. Локальное облучение приводило к резкому уменьшению интенсивности и уширению спектра ЭПР, что характеризует нарушение проницаемости клеточной мембраны в разных слоях кожи.
2. Профилактическое применение мази тиотриазолина предотвращало нарушение барьерных свойств клеточных мембран кожи, нарушенных вследствие облучения.

Литература

1. Мороз В. А. Діагностика і лікування місцевих променевих ушкоджень після променевої терапії та радіаційних аварій: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня д-ра мед. наук : 14.01.23 „Променева діагностика та променева терапія” / В. А. Мороз. – К., 2001. – 35 с.
2. Хосева Е.Н. Дерматологические последствия лучевой терапии онкологических больных / Е. Н. Хосева, Н. П. Малишевская, С. А. Берзин [и др.] // Альманах Клинической медицины. – 2006. – Т. 1. – С. 154–159.
3. Сімонова Л.І. Вплив біоактивної добавки з морських гідробіонтів «Біполан» на стан периферичної крові в осіб, професійно пов'язаних із дією іонізуючої радіації / Л. І. Сімонова, П. М. Музикант, Л. В. Хмелевська [та ін.] // Український радіологічний журнал. – 2007. – Т. 12, № 4. – С. 435–439.
4. Бардычев М. С. Местные лучевые повреждения / М. С. Бардычев, А. Ф. Цыб. – М.: Медицина, 1985. – 240 с.

5. Звягинцева Т. В. Воспалительно-репаративные явления в патогенезе местных лучевых повреждений кожи автореф. дис. на здобуття наук. ступеня д-ра. мед. наук : спец. 14.03.04 „Патологічна фізіологія” / Т. В. Звягинцева. – Харьков, 2001. – 299 с.
6. Барабой В. А. Лучевое поражение как стресс: биохимические механизмы радиационного стресса / В. А. Барабой // Тез. докл. Радиобиол. Съезда. – М., 1993. – № 1. – С. 72–73.
7. Шишкина Л. Н. Связь повреждения мембраны и ДНК с процессом перекисного окисления липидов при слабых воздействиях / Л. Н. Шишкина, М. А. Смотровая // Биофизика. – 2000. – Т. 45, № 5. – С. 884–882.
8. Поливода Б. И. Биофизические аспекты радиационного поражения биомембран / Б. И. Поливода, А. В. Конев, Г. А. Попов. – М.: Энергоатомиздат, 1999. – 268 с.
9. Товстак В. В. Исследования влияния радиации на структуру мембран тимоцитов методом флюоресцентных зондов / В. В. Товстак // Биологический вестник. – 1998. – Т. 2, № 1. – С. 54–56.
10. Современные методы биофизических исследований: Практикум по биофизике / А. А. Булычев, В. Н. Верхотуров, Б. А. Гуляев [и др.]; под ред. А. Б. Рубина. – М.: Высшая школа, 1988. – 359 с.
11. Лихтенштейн Г. И. Метод спиновых меток в молекулярной биологии / Г. И. Лихтенштейн // М.: Наука, 1974. – 256 с.
12. Куна П. Химическая радиозащита / П. Куна // М.: Медицина, 1989. – 192 с.
13. Бондарук О.С. Комплексна профілактика та корекція променевих дерматитів при хемопроменевому лікуванні поширеного раку грудної залози / О. С. Бондарук, В. С. Іванкова, Л. М. Барановська [та ін.] // Український радіологічний журнал. – 2002. – Т. 10, № 3. – С. 260–262.
14. Бирик В. В. Тиотриазолин: фармакология и фармакотерапия (обзор литературы) / В. В. Бирик, Д. М. Болгов // Украинский медицинский альманах. – 2000. – № 4. – С. 226–229.
15. Желнин Е. В. Стимуляция регенеративных процессов в полости рта у пациентов чернобыльского контингента при амбулаторных хирургических вмешательствах / Е. В. Желнин // Экспериментальная и клиническая медицина. – 2005. – № 4. – С. 60–63.
16. Звягинцева Т. В. Эффективность применения «мази тиотриазолина 2%» для профилактики лучевых реакций кожи / Т. В. Звягинцева, С. И. Миронченко // Материалы III общероссийской научной конференции «Современные проблемы науки и образования», М., 2008. – Фундаментальные исследования. – 2008. – № 5. – С. 16–17.
17. Звягинцева Т. В. Моделивання місцевих променевих пошкоджень шкіри / Т. В. Звягинцева // Фізіологічний журнал. – 1998. – Т. 44, № 56. – С. 106–112.
18. Анциферова Л.И. Атлас спектров электронного парамагнитного резонанса спиновых меток и зондов / Л. И. Анциферова, А. М. Вассерман и др. – М.: Наука, 1977. – 160 с.

Реферат

МЕМБРАНОПРОТЕКТОРНА ДІЯ МАЗІ ТІОТРИАЗОЛІНУ ПРИ ДІЇ НА ШКІРУ ІОНІЗУЮЧОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ

Звягинцева Т.В., Миронченко С.І., Найді О.А., Желнін Є.В.

Ключові слова: шкіра, іонізуюче випромінювання, електронний парамагнітний резонанс, тиотриазолін

Вивчено вплив мазі тиотриазоліну на бар'єрні функції клітинних мембран шкіри за допомогою методу електронного парамагнітного резонансу при локальному іонізуючому опроміненні. Методом електронного парамагнітного резонансу підтверджений мембраноушкоджувальний ефект іонізуючого випромінювання. В опромінених тварин виявлені порушення проникності клітинних мембран шкіри, що проявляється різким зменшенням інтенсивності та поширенням спектру електронного парамагнітного резонансу. Мазь тиотриазоліну при дії на шкіру іонізуючого випромінювання виявляла мембранопротекторну дію. Характер змін спектрів електронного парамагнітного резонансу при застосуванні мазі тиотриазоліну свідчив про відсутність ушкоджувальної дії опромінення на бар'єрні властивості клітинних мембран.

Summary

MEMBRANE PROTECTIVE EFFECT OF THIOTRIAZOLINE OINTMENT ON THE SKIN EXPOSED TO IONIZING RADIATION

Zvjagintseva T.V., Mironchenko S.I., Nardid O.A., Zhelnin Ye.V.

Key words: skin, ionizing radiation, electronic paramagnetic resonance, thiotriazoline

There has been studied the effect produced by thiotriazoline ointment on barrier functions of skin cellular membranes by electronic paramagnetic resonance method under the local ionizing irradiation exposure. The effect of membrane injuries caused by the ionizing radiation was confirmed by electronic paramagnetic resonance method. Animals exposed to the radiation showed the disturbances of skin cell membrane permeability manifested by abrupt reduction of intensity and widening of the electronic paramagnetic resonance spectrum. Thiotriazoline ointment provides the membrane protective effect on the skin exposed to the ionizing radiation. Character of spectra change of electronic paramagnetic resonance under thiotriazoline ointment application testified to the absence of damaging action of irradiation on the barrier properties of cellular membranes.