

Что касается отдельных фракция эфирного масла, то характер их действие отличался от исходного масла. Для легкой фракции после резкой деполяризации при концентрации 0,001 % отмечалось снижение величины сдвига потенциала при более высоких концентрациях (0,003 и 0,01 %). При дальнейшем росте содержания этой фракции(до 0,03 %) вновь нарастало деполяризующее действие. Столь сложная зависимость отмечалась и для сдвигов сопротивления (см. рис. 2).

«Тяжелая фракция» в концентрации 0,001% вызывала деполяризацию мембраны, сопровождающуюся ростом сопротивления. При более высоких концентрациях отмечалась дальнейшая деполяризация, и резкое снижение сопротивления. При чем при концентрации этой фракции, больше чем 0,01%, наблюдалась гибель отдельных клеток.

Проведенные нами исследования показали, что отдельные компоненты эфирного масла оказывают различное действие на электрофизиологические характеристики плазмалеммы и циклоз в клетках харовой водоросли. При чем электроальгологическое и цитокинетическое тестирование позволяет экспрессно дифференцировать биологическую активность отдельных фракций эфирного масла и провести первичную оценку качества образцов эфирного масла.

МОДЕЛИРОВАНИЕ IN VITRO МЕХАНИЗМОВ РАЗВИТИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ПЕЧЕНИ И ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ДЕЙСТВИЯ ПРИРОДНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ

А. Ю. Россоловская

1. ВВЕДЕНИЕ

Заболевания печени занимают значимое место среди болезней человека. Они ухудшают качество жизни, нередко приводя к летальному исходу. Накопленная информация свидетельствует о существенной роли окислительного стресса в патогенезе заболеваний печени [3].

Окислительный стресс сопровождается интенсификацией процессов генерации активных форм кислорода (АФК) [2 – 5].

Согласно данным литературы, в реакциях генерации АФК одну из ключевых ролей играют переходные металлы (Fe^{3+} и Cu^{2+} в частности) [4]

При патологических состояниях, обусловленных различными заболеваниями, в печени нарушаются процессы образования и оттока желчи (холестаз) [1]. В результате этого происходит накопление меди (II) и билирубина, которые способны вступать в реакции комплексообразования,

сопровождающиеся генерацией $\text{OH}^\bullet$ -радикалов вследствие восстановления Cu (II) до Cu (I) [3]. Таким образом, при заболеваниях печени создаются реальные условия для роста количества потенциальных центров генерации АФК.

Вместе с тем вклад окислительного стресса в патогенез заболеваний печени до конца не изучен. В связи с этим актуальным является моделирование патобиохимических процессов, провоцирующих окислительный стресс при нарушении образования и оттока желчи в кишечник. Такого рода модели позволяют глубже понять механизмы, отвечающие за инициацию и последствия свободнорадикальных реакций при заболеваниях печени. Кроме того данные экспериментальные модели могут быть использованы для предварительного отбора гепатопротекторов направленного действия, которые обеспечивают устранение конкретных патогенетических факторов, играющих важную роль в развитии окислительного стресса при заболеваниях печени.

Одним из последствий окислительного стресса при заболеваниях печени является инициация процессов перекисного окисления липидов, вызывающих серьезные нарушения клеточного метаболизма [1,3,4,5].

В связи с этим целью работы стало создание и использование для поиска потенциальных гепатопротекторов экспериментальной модели генерации АФК, основанной на феномене комплексообразования билирубина с медью. Отличительной чертой данной системы является моделирование реальных патобиохимических условий, приводящих к развитию окислительного стресса при заболеваниях печени.

2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Генерирование свободных радикалов в системе медь-билирубин.

Реакцию проводили в 0,05 М Na-фосфатном буфере pH 7,4,

В реакционную среду вносились образцы митохондриальной и микросомальной фракций печени крыс, концентрация белка в которых составляла 0,8 – 1 мг/мл; 200 мкМ хлорида меди (II), CuCl_2 , 200 мкМ билирубина.

Флавоноиды вносились в среду инкубации в концентрациях от 25 до 200 мкМ.

После инкубации реакционной смеси в темноте в течение 2 часов в микросомальной и митохондриальной фракциях спектрофотометрические определяли малоновый диальдегид с помощью ТБК при 532 нм.

2.2. Получение микросомальной фракции печени крыс

Работа проводилась на самцах белых крыс весом 180–220 г., содержащихся на стандартном рационе вивария. Животные умерщвлялись декапитацией и все дальнейшие операции проводились при температуре 0–+4 С.

Печень гомогенизировали в 25 мМ Трис-НСl буфере (рН 7,4), содержащем 250 мМ сахарозу; 1 мМ ЭДТА. 20% гомогенат центрифугировали при 18000 g в течение 20 минут. Полученный супернатант затем центрифугировали при 57000 g в течении 2 часов. В качестве микросомальной фракции рассматривали осадок.

2.3. Получение митохондриальной фракции

Для получения митохондриальной фракции навеску печени гомогенизировали в 0,25% сахарозе. Гомогенат центрифугировали при 1600 g в течение 20 минут. Надосадок сливали и центрифугировали при 12000 g в течение 10 минут. Осадок ресуспендировали в 0,1М фосфатном буфере рН 7,4 и центрифугировали 10 минут при 12000 g. После второй отмывки осадок ресуспендировали в 0,1М фосфатном буфере, рН 7,4.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нами были подобраны оптимальные условия генерации АФК в системе медь-билирубин. Об интенсивности образования АФК судили по накоплению ТБК-активных продуктов в микросомальной и митохондриальной фракциях печени крыс.

Накопление ТБК-активных продуктов как в митохондриальной, так и микросомальной фракциях линейно увеличивается с увеличением концентрации меди либо билирубина (рис. 1).

Накопление ТБК-активных продуктов также зависит от времени инкубации. Максимальный эффект достигается через 2 часа как для митохондриальной, так и для микросомальной фракции.

На следующем этапе мы использовали систему медь-билирубин для оценки антиоксидантной активности флавоноидов различной химической структуры. Были изучены флавоноиды, отличающиеся друг от друга положением и количеством, ОН-групп, а также были исследованы метоксипроизводные отдельных флавоноидов. В работе использовались следующие флавоноиды: хризин (5,7-дигидрокси-флаван), галангин (3, 5, 7-тригидроксифлаван), 3-гидроксифлаван, 3-метоксифлаван, кверцетин.

При внесении вышеперечисленных флавоноидов в реакционную смесь в диапазоне концентраций от 10 до 200 мкМ наблюдалось снижение накопления МДА как в микросомальной, так и в митохондриальной фракциях (рис. 2).

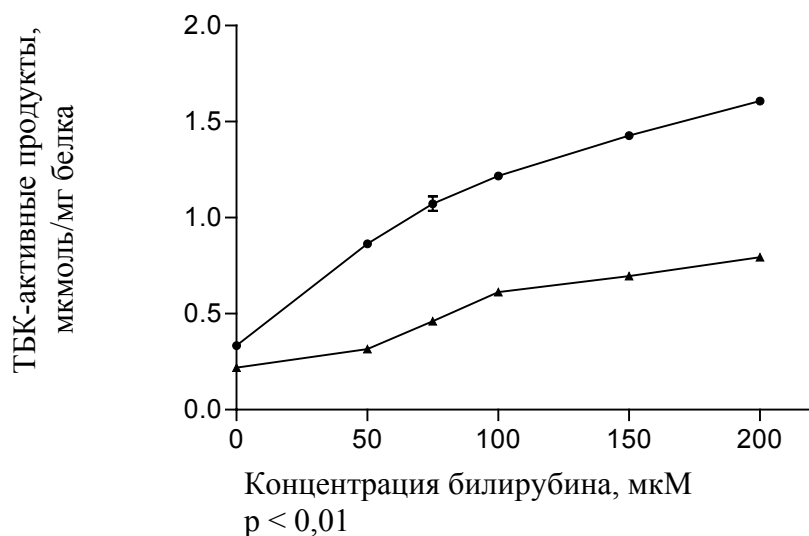


Рис. 1. Зависимость накопления ТБК-активных продуктов от концентрации билирубина

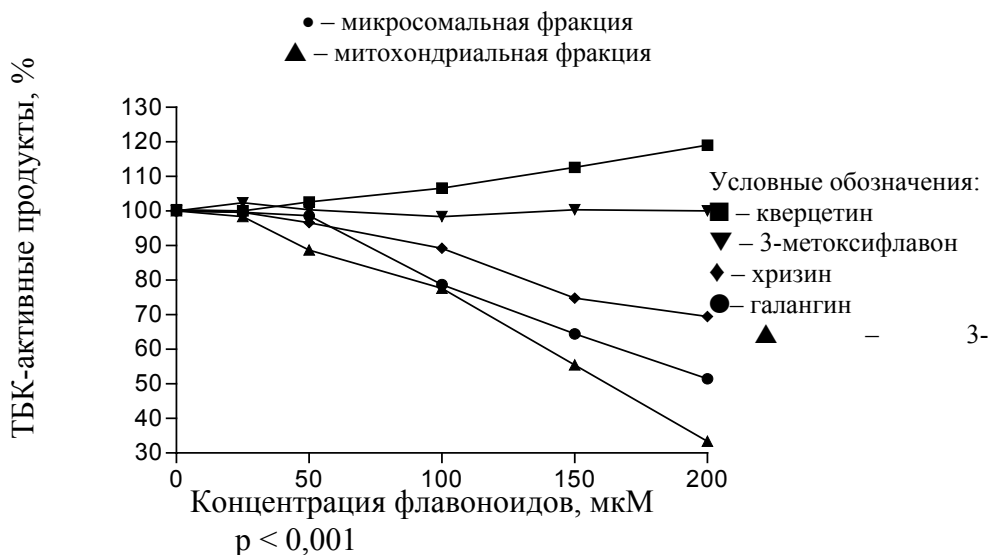


Рис. 2. Зависимость накопления ТБК-активных продуктов от концентрации флавоноидов

Однако, кверцетин в данном диапазоне концентраций проявлял про-оксидантные свойства, в тоже время являясь антиоксидантом в концентрациях равных $10^{-9} - 10^{-7}$ М (данные не представлены).

Сравнение эффектов, вызываемых 3-гидроксифлавоном и 3-метоксифлавоном, свидетельствует о том, что антиоксидантные свойства флавоноидов во многом определяются ОН-группой в 3-м положении (рис. 2).

Полагают, что антиоксидантные свойства флавоноидов обусловлены их способностью хелатировать ионы переходных металлов. Поэтому на следующем этапе была изучена способность флавоноидов хелатировать ионы Cu (II). При образовании комплексов наблюдается смещение характерных для исходного флавоноида максимумов поглощения в длинноволновую область, внесение же в среду хелатора (ЭДТА) приводит к восстановлению исходных спектров (данные не представлены). Это также доказывает, что наблюдаемые спектральные изменения обусловлены образованием комплекса флавоноид-медь. Таким образом, антиоксидантные свойства изученных в работе флавоноидов могут быть во многом обусловлены их способностью хелатировать медь.

4. ВЫВОДЫ

Полученные результаты свидетельствуют о том, что избыточное накопление в печени меди и билирубина может инициировать процессы ПОЛ. Созданная модель может быть эффективно использована для поиска потенциальных антиоксидантов гепатопротекторного профиля.

Литература

1. Шерлок Ш., Дули Дж. Заболевания печени и желчных путей / М., «Медицина», 859 с., 1999
2. Farhan Asad S et al Bilirubin-Cu (II) complex degrades DNA // Biochem. Biophys. Acta., 1428; 1999, 201–208;
3. Gille G., Sigler K Oxidative stress and living cells // Folia Microbiol. 40 (2), (1995), 131–152
4. Guetens G. et al. Oxidative DNA damage: biological significance and methods of analysis // Critical reviews in laboratory sciences, 39(4&5): 2002, 331–457
5. Heinecke Jay W. Oxidized amino acids: culprits in human atherosclerosis and indicators of oxidative stress // Free Radical Biology & Medicine, Vol 32, No 11, 2002, 1090–1101

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ВЛИЯНИЯ МУТАЦИИ В ГЕНЕ *PELW* НА ПРОДУКЦИЮ ФАКТОРОВ ВИРУЛЕНТНОСТИ И ПАТОГЕННОСТИ У БАКТЕРИЙ *ERWINIA* *CAROTOVORA* SUBSP. *ATROSEPTICA*

С. А. Скобляков

Фитопатогенные бактерии *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Eca) при взаимодействия с хозяйским организмом (растения картофеля) секретируют в окружающую среду ряд ферментов (пектиназы, целлюлазы, протеазы и др.), разрушающих ткани растения, что приводит к развитию симптомов заболевания «черная ножка» [5].