

- Mельникова Н. М., Ворошилова Н. М. Вікові особливості вмісту кадмію в організмі отриманих ним щурів за дії експериментального метаболічного ацидоzu // Укр. біохім. журн. — 2007. — Т. 79, N 1. — С. 108—112.
- Мельничук Д. О., Михайлівський В. О. Механізми метаболічної адаптації // Укр. біохім. журн. — 2000. — Т. 72, N 4—5. — С. 70—80.
- Рослый И. М., Абрамов С. В., Покровский В. И. Ферментемия — адаптивный механизм или маркер цитолиза? // Вестн. РАМН. — 2002. — N 8. — С. 3—8.
- Синєк Л. Л. Особливості кислотно-лужжиних резервів при старінні // Укр. біохім. журн. — 1976. — Т. 48, N 1. — С. 72—77.
- Тиунов Л. А. Биохимические механизмы токсичности // Общие механизмы токсичности. — Л., 1986. — 174 с.
- Трахтенберг И. М., Иванова Л. А. Тяжелые металлы и клеточные мембранны // Медицина труда и пром. экологии. — 1999. — N 11. — С. 28—32.
- Трахтенберг И. М., Колесников В. С., Луковенко В. П. Тяжелые металлы во внешней среде: современные гигиенические и токсикологические аспекты. — Минск: Наука и техника, 1994. — 258 с.
- Melnikova N. N., Voroshilova N. M. Importance of age aspect in regulation of activity of some rat liver enzymes // Materials of IV International Young Scientists conference "Biodiversity. Ecology. Adaptation. Evolution", dedicated to 180th anniversary from the birth of famous physiologist Ivan Sechenov September 16—19, 2009, Odessa. — P. 163—164.
- Shaikh Z. A., Vu T. T., Zaman K. Oxidative stress as a mechanism of chronic cadmium — induced hepatotoxicity and renal toxicity and protection by antioxidants // Toxicol. Appl. Pharmacol. — 1999. — V. 154, N 3. — P. 256—263.
- The effects of cadmium on glucose and L-ascorbic acid absorption and glucose accumulation in rat intestines / B. Dolezych, St. Dolezych, A. Sematloch et al. // Acta. biol. silec. — 1990. — Vol. 15, N 1. — P. 42—50.
- Voitsitskiy V. Principal component analysis of chronic influence of low-doses of ionizing radiation and cadmium on organisms // Equidosemetry. — Springer. — 2005. — Vol. 2. — P. 389—402.

УДК 577. 115:616. 36—085

В. А. Грищенко¹, В. А. Томчук¹,
О. М. Литвиненко¹, В. О. Чернишенко^{2,3},
Т. М. Платонова²

ДІАГНОСТИКА ПОРУШЕНЬ КОАГУЛЯЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ПРИ МЕДИКАМЕНТОЗНОМУ ГЕПАТИТИ ТА ЇХ КОРЕКЦІЯ

- Національний університет біоресурсів і природокористування України
- Інститут біохімії імені О. В. Палладіна НАН України
- Київський Національний університет імені Тараса Шевченка

Стрімке поширення захворювань печінки, що супроводжуються розладами коагуляційних процесів з прогресуючим перебігом та несприятливим прогнозом, потребує точної діагностики ступеню функціональних порушень цього органу та відповідної оптимізації фармакотерапевтичних заходів. Негативна дія токсичних речовин на печінку викликає широкий спектр патологічних змін на різних рівнях її організації. Корегування цих розладів не завжди виявляється ефективним, оскільки потрібно не тільки усунути фактор ушкодження, але й сприяти швидкому відновленню порушених функцій печінки [9, 10].

Як відомо, у патогенезі запальних, дистрофічних та дегенеративних процесів, що супроводжують гепатит, важливі місце займають розлади структурно-функціонального стану клітинних мембрани гепатоцитів. Вони є наслідком посиленого пероксидного окислення мембраних ліпідів та фосфоліпідного гідролізу і виснаження внутрішньоклітинних запасів АТФ у мітохондріях. Зважаючи на те, що пошкодження мембрани гепатоцитів спостерігається при всіх захворюваннях печінки, патогенетично обумовленим є призначення терапії, що має відновлювальну дію на структуру та функції клітинних мембран і забезпечує гальмування процесів деструкції клітин. Тому за розвитку гепатопатології актуальним є додаткове введення в організм фосфоліпідів, які є головними компонентами клітинних мембран і здатні відновлювати їх структуру та функції [2, 5, 9, 10].

Фосфоліпіди виконують в організмі ряд важливих функцій, основними з яких є стимулювання активності різних ферментних систем, участі

ІНТЕГРАЦІЯ МЕТАБОЛІЧЕСКИХ ІНЗИМОЛОГІЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВІ КРЫС, ОТРАВЛЕННИХ СУЛЬФАТОМ КАДМИЯ

Н. Н. Мельникова, Н. М. Ворошилова

В статье рассматриваются биохимические показатели крови крыс, отравленных сульфатом кадмия. При отравлении крыс тяжелыми металлами наблюдаются изменения биохимических показателей крови, что может быть связано с нарушением ряда процессов в организме. Исследование содержания рассматриваемых биохимических параметров представляет фундаментальную характеристику ряда состояний организма как животного, так и человека.

INTEGRATION OF METABOLIC AND ENZYMIC BLOOD INDICES OF RATS POISONED WITH CADMIUM SULPHATE

N. N. Melnikova, N. M. Voroshilova

The article deals with biochemical indices of blood of rats poisoned with cadmium sulphate. The changes of some biochemical blood indices are observed under the conditions of rats poisoning with heavy metal, which may be connected with the failure of some processes in a body. The analysis of content of data of biochemical parameters can also be regarded as the prior basic testimony of some states of an organism of both an animal and a man.

у процесах молекулярного транспорту, поділу та диференціації клітин [1].

Джерелом фосфоліпідів для фармацевтичного виробництва найчастіше є бобові культури (соя) і морепродукти. Проте за хімічним складом за-значенні сполуки істотно відрізняються від тих, що входять до складу клітинних мембрани ссавців, оскільки містять есенційні жирні кислоти. Це спонукало науковців кафедри біохімії тварин, якості і безпеки сільськогосподарської продукції імені акад. М. Ф. Гулого Національного університету біоресурсів і природокористування України до створення засобу на основі фосфоліпідів тваринного походження (маслянки — побічного продукту перероблення молока на масло) — біологічно активної добавки (БАД) FLP-MD [8]. Її сировина є природною для ссавців і тому може бути ефективною, як терапевтичний засіб у випадку структурно-функціональних порушень клітинних мембрани гепатоцитів та супутніх розладів білкового синтезу. Так, порушення посттрансляційного карбоксилювання вітамін K-залежних білків (компонентів системи зсідання крові — протромбіну, протейнів C і S та факторів зсідання крові VII, IX, X) призводить до втрати їх функціональних властивостей. Виявлення таких форм білків в кровотоці свідчить як про хворобу печінки, так і про порушення динамічної рівноваги між ланками системи гемостазу [12, 14].

Метою роботи була адаптація методу визначення функціонально неактивних форм протромбіну для контролю за функціональним станом печінки при експериментальному медикаментозному гепатиті та з'ясування можливості корегування виявлених порушень за допомогою еталонного фосфоліпідовмісного препарата “Есенціале-форте” і новоствореної БАД FLP-MD.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Для проведення експериментальних досліджень використовували білих лабораторних шурів-самців тримісячного віку з серединною масою тіла 200–220 г, з яких формували три дослідні групи та контрольну по 10 шурів у кожній. Перед початком експерименту тварин витримували на карантині впродовж 2 тижнів. Проводили моніторинг зміни маси тіла піддослідних тварин. Тривалість досліду становила 65 діб.

Медикаментозну форму токсичного гепатиту викликали за розробленою співробітниками кафедри біохімії тварин, якості і безпеки сільсько-

господарської продукції імені акад. М. Ф. Гулого Національного університету біоресурсів і природокористування України біологічною моделлю [7] шляхом перорального застосування препарату “Діклофенак” в таблетках, що виробляється ВАТ Хімфармзавод “Червоні зірки” у м. Харкові, і входить до групи нестероїдних протизапальних препаратів, у дозі 12,5 мг/кг маси тіла один раз на добу, впродовж двох тижнів. Спостерігали за змінами загального стану тварин, наявністю симптомів інтоксикації.

Тваринам I групи вводили препарати “Есенціале-форте” (фірми “Ей. Наттерманн енд Сай ГмБХ”, Німеччина) в дозі 7,1 мг/кг маси тіла. Тваринам II групи вводили БАД FLP-MD (ліпосомальна форма, 1%-й розчин) репаративної дії в дозі 13,5 мг/кг маси тіла. БАД FLP-MD — це суміш різних класів фосфоліпідів (80% фосфатидилхоліну, сфінгомієліну, фосфатидилетаноламіну), ненасичених жирних кислот (лінолевої, ліноленової, олеїнової) та природних антиоксидантів — вітамінів (α-токоферолу і ретинолу ацетату). Лікування проводили впродовж 50 діб.

До III групи належали тварини, яких піддавали самореабілітації (без лікування).

До контрольної групи віднесено ін'tактних тварин, яких утримували на стандартному рационі віварію з пероральним введенням їм еквівалентної кількості фізіологічного розчину. Показники екамулінового та тромбопластинового тестів у шурів контрольної групи використовували для обрахунку екамулінового та протромбінового відношення у дослідних тварин.

Стійкі та виражені клінічні ознаки захворювання починали проявлятися у піддослідних тварин вже на сьому добу введення діклофенаку та характеризувались загальним пригніченням, зниженням апетиту, постійним зменшенням маси тіла у середньому по групі на 12 г, тъмяним шерстяним покривом, зниженням еластичності шкіри, болючістю, тимпанічністю живота, рідкими, неприємного запаху каловими масами з рештками неперетравленого корму.

Показники коагуляційної системи досліджували в плазмі аортальної крові, яку збирали у пробірки з додаванням стабілізатора — 3,8% розчину натрію цитрату, потім центрифугували при 1400 g упродовж 10 хв.

Амідолітичну активність тромбіну (здатність гідролізувати трипептидині субстрати X-X-X-pNa) визначали, використовуючи хромогенний субстрат тромбіну (S2238) в 0,05 M трис-HCl буфері,

pH 7,4 з 0,13 M NaCl при температурі 37°C. Для цього в лунку планшети для культури клітин вносили 10 мкл досліджуваної плазми щура, 10 мкл 0,025 M CaCl₂, 10 мкл активатора протромбіну (екамуліну або тромбопластину), 25 мкл 3 mM хромогенного субстрату та 0,05 M трис-HCl буфер, pH 7,4 з 0,13 M NaCl (загальний об'єм інкубаційного середовища — 250 мкл).

Вивільнення п-нітроаніліну (pNA) під дією тромбіну визначали спектрофотометрично, вимірюючи оптичне поглинання в області 405 нм і віднімаючи значення поглинання за 492 нм. Для розрахунку концентрації pNA використовували коефіцієнт молярної екстинкції: $\epsilon = 1,27 \cdot 10^{-4} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (при 316 нм в H₂O).

Результати протромбінового та екамулінового тестів виражали у вигляді протромбінового (ПВ) та екамулінового (ЕВ) відношення:

$$\text{ПВ} = (\text{Ad}/\text{Ap})\text{MЧ} \quad (1)$$

$$\text{ЕВ} = \text{Ad}/\text{Ap} \quad (2)$$

де Ap — амідолітична активність тромбіну плазми крові дослідних тварин під дією тромбопластину (1) та екамуліну (2); Ad — амідолітична активність тромбіну плазми крові тварин контрольної групи під дією тромбопластину (1) та екамуліну (2); MЧ — Міжнародний Індекс Чутливості препарату тромбопластину [3, 4].

Експериментальні дані обробляли загально-прийнятими методами статистики [6] з використанням критерію Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Причини захворювань печінки численні та різноманітні, однак основні ланки їх патогенезу

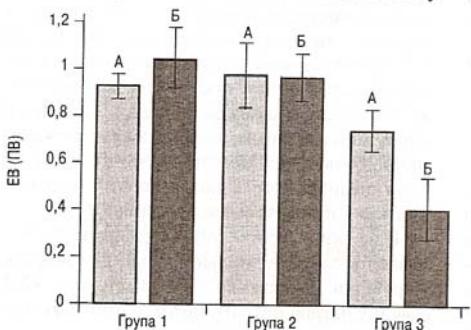


Рис. А — екамулінове (ЕВ) і Б — тромбопластинове (ПВ) відношення, визначене в плазмі крові щурів при медикаментозному гепатиті (група 3) та при його корегуванні фосфоліпідовмісними препаратами — “Есенціале-форте” (група 1) та БАД FLP-MD (група 2)

універсальні. Провідним механізмом ураження печінки є ушкодження мембрани гепатоцитів, що призводить до порушення обміну речовин і загибелі клітин. Поряд з цим відбувається порушення біосинтезу фосфоліпідів — найважливіших компонентів клітинних мембрани. Дефіцит фосфоліпідів при патології печінки ще більше ускладнює патологічні зміни у структурі мембрани.

Як відомо, у гепатоцитах відбувається синтез фібриногену, активаторів та інгібіторів каскаду ферментативних реакцій системи зсідання крові [11]. Порушення функціонування печінки приводить до кровотеч внаслідок зниження протокоагулянтного потенціалу крові.

При патології печінки, як і при дефіциті вітаміну K, порушується посттрансляційне γ -карбоксилювання вітамін K-залежних білків: попередників протромбіну, факторів VII, IX, X, протеїнів C, S і Z на фоні гіпофібриногенемії [13, 15, 16]. Декарбоксиловані форми вітамін K-залежних білків, що не беруть участь у процесі зсідання крові, отримали назву РІВКА (PIVKA — протейн, що утворюється за відсутності вітаміну K) [14].

Відновлення вмісту функціонально активних вітамін K-залежних факторів зсідання крові може свідчити про нормалізацію функціонування печінки під час лікування. Однак відрізняти серед інших коагуляційні патології, пов’язані з появою у периферичній крові РІВКА-білків, доступними у клініці методами неможливо. Тому для виявлення порушень синтезу білків, контролю ефективності лікування та відновлення функціонування печінки необхідно використовувати

комплекс діагностичних тестів, який дає інформацію про синтез та функціональний стан вітамін K-залежних білків.

Наші дослідження було зосереджене на визначенні вмісту та функціонального стану протромбіну — попередника ключового регуляторного ферменту системи гемостазу, тромбіну. Рівень протромбіну в плазмі крові в лабораторній практиці визначають за часом зсідання плазми крові під дією екзогенного активатора протромбіну — тромбопластину. За допомогою цього методу визначається вміст функціонально активного протромбіну, РІВКА-протромбін тромбопластином не активується. Сумарний рівень протромбіну можна визначити, використовуючи ферменти-активатори протромбіну зі змінних отрут.

Одним із таких ферментів є екамулін, виділений нами з отрути ефи багатолускової (*Echis multisquamatis*), який використовувався в цих дослідженнях. Екамулін активує як протромбін, так і його PIVKA-форму. Отже, за різницю показників тромболастинового та екамулінового тестів можливо оцінювати вміст функціонально неактивного протромбіну.

В даних тестах нами використано тромбін-специфічний хромогенний субстрат, який, на відміну від коагуляційних тестів, дозволяє уникнути впливу інгібіторів полімеризації фібрину на отримані результати. У цьому разі утворений при активації протромбіну тромбін безпосередньо призводить до розщеплення хромогенного субстрату, а не до перетворення фібриногену на фібрин з подальшою його полімеризацією, як у коагуляційному тесті. Крім того було показано, що тести з використанням тромбін-специфічного хромогенного субстрату менш чутливі до гепарину порівняно з коагуляційними [3, 4]. Результати протромбінового та екамулінового тестів виражали у вигляді ПВ та ЕВ відношень.

Такий підхід було використано нами для аналізу стану системи зсідання крові шурів з індукованою медикаментозною формою токсичного гепатиту, викликаного шляхом перорального застосування препаратору "Діклофенак".

На рис. показано, що у шурів 3-ї групи, яким не проводили лікування, ПВ складає 0,4. Це свідчить про суттєве зменшення вмісту функціонально активного протромбіну внаслідок поширення посттрансляційної модифікації вітамін K-залежних білків гепатоцитами печінки. При цьому кількість синтезованого протромбіну знижується тільки на 30%, про що свідчить ЕВ, яке дорівнює 0,7.

Водночас у шурів II групи, яких лікували БАД FLP-MD (на основі фосфоліпідів молока), ПВ дорівнювало ЕВ. Це свідчить про відновлення синтезу протромбіну та загальну нормалізацію процесу синтезу білків клітинами печінки. Analogічний результат отримано і у тварин I групи, яких лікували відомим фармацевтичним препаратом "Есенціале-форте" (на основі фосфоліпідів сої).

Отримані результати свідчать, що новостворена БАД FLP-MD виявляє схожий з препаратором "Есенціале-форте" ефект біологічної дії на функціональний стан пошкоджених гепатоцитів, який не залежить від походження їх основної діючої речовини — фосфоліпідів. Це підтверджує

реparативні властивості зазначених фосфоліпідовмісних лікувальних засобів, які, як відомо [5, 8], обумовлені стимулюванням регенерації клітинних мембрани і з'язаніх з ними рецепторів, підвищеннем детоксикаційної здатності печінки та нормалізацією її синтетичної функції. При цьому відновлення вмісту функціонально активного протромбіну після їх застосування свідчить про нормалізацію процесів карбоксилювання білків у печінці, а отже, і про ефективність проведеної терапії.

Таким чином, виявлення функціонально неактивних форм протромбіну (PIVKA-протромбін) за допомогою пари тестів — екамулінового і тромболастинового, дозволяє визначати функціональний стан печінки та контролювати ефективність дії препаратів, спрямованих на його відновлення за розвитку медикаментозної форми гепатиту.

ЛІТЕРАТУРА

1. Афонина Г. Б. Липиды, свободные радикалы и иммунный ответ / Г. Б. Афонина, Л. А. Куон. — К.: Нац. мед. ун.-т., 2000. — 285 с.
2. Биохимия человека: в 2-х томах / [Р. Марри, Д. Греннер, П. Мейес, В. Родузал]. — М.: Мир, 1993. — 384 с.
3. Визначення функціонально неактивних форм протромбіну для контролю ефективності лікування антикоагулянтами непрямого дії / Д. С. Корольова, В. А. Деев, С. І. Куповська, Т. М. Чернишенко, Т. М. Платонова, Е. В. Луговської // Лаб. діагностика. — 2009. — N 2 (48). — С. 3–12.
4. Використання екамуліну — активатора протромбіну з отрути ефи багатолускової в клінічній лабораторній діагностіці / Д. С. Корольова, Р. П. Виноградова, Т. М. Чернишено, Т. М. Платонова, Г. Л. Волков // Лаб. діагностика. — 2006. — N 3 (37). — С. 18–22.
5. Кунц Э. «Эссенциальные» фосфолипиды в гепатологии (экспериментальный и клинический опыт) / Э. Кунц, К.-Й. Гундерманн, Э. Штайнер // Тер. архив. — 1994. — Т. 66, N 2. — С. 66–72.
6. Кучеренко М. Є., Бабенюк Ю. Д., Войціцкий В. М. Сучасні методи біохімічних досліджень. — К.: Фіто-скусцентр, 2001. — 424 с.
7. Моделювання медикаментозного гепатиту в лабораторних шурів: матеріали IV міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів [«Молодь і поступ біології»] (Львів, 7–10 квітня 2008 р.) / О. М. Литвиненко, В. А. Грищенко — Львів, 2008. — С. 432–433.
8. Пат. 78305 Україна, MK1 A 61K 35/20. Ветеринарна біологічно активна добавка та спосіб ре паративної терапії при диспенсії новонароджених телят / Мельничук Д. О., Грищенко В. А.; заявник і патентовласник Національний аграрний ун.-т. — N 20041108957; заявл. 02.11.2004; опубл. 15. 03. 2007, Biol. N 3. — 2 с.
9. Рекомендації з терапії і профілактики шалунково-кишкових хвороб у новонароджених та молодняку тварин: [Прекомандатії для сільськогосподарських підприємств України та практичних фахівців ветеринарної медицини] / М. І. Цвітіховський, В. І. Береза, В. А. Грищенко та ін. — К.: НАУ, 2004. — 39 с.

10. Розповсюдження та основні напрями лікування хвороб травного каналу у новонароджених і молодняку тварин / М. І. Цвіліховський, В. І. Береза, О. М. Якимчук та ін. // Наук. праці Одеського державного аграрного університету: Забезпечення ветеринарно-санітарного благополуччя тваринництва, якості і безпеки продукції. — 2004. — Ч. II. — С. 7–11.
11. Amitrano L., Guardascione M. A., Brancaccio V., Balzano A. Coagulation disorders in liver disease // Semin Liver Dis. — 2002 — Vol. 22, N 1. — P. 83–96.
12. Hematology: basic and practice // ed. by R. Hoffman, E. J. Benz, S. J. Shattil, B. Furie, H. J. Colen, L. E. Silberstein. — New York: Churchill Livingstone, 1995. — 2369 p.
13. Lisman T., Leebeek F. W. Hemostatic alterations in liver disease: a review on pathophysiology, clinical consequences, and treatment // Dig Surg. — 2007. — Vol. 24, N 4. — P. 250–258.
14. Solano C., Cobcroft R. G., Scott D. C. Prediction of vitamin K response using the Echis time and Echis-Prothrombin time ratio // Thrombosis and haemostasis. — 1990. — Vol. 64, N 3. — P. 353–357.
15. Trotter J. F. Coagulation abnormalities in patients who have liver disease // Clin Liver Dis. — 2006. — Vol. 10, N 3. — P. 665–678.
16. Wada H., Usui M., Sakuragawa N. Hemostatic abnormalities and liver diseases // Semin Thromb Hemost. — 2008. — Vol. 34, N 8. — P. 772–778.

**ДІАГНОСТИКА НАРУШЕНЬ
КОАГУЛЯЦІОННИХ ПРОЦЕССОВ
ПРИ МЕДИКАМЕНТОЗНОМ ГЕПАТИТЕ
ІХ КОРРЕКЦІЯ**

*В. А. Грищенко, В. А. Томчук, О. М. Литвиненко,
В. А. Чернищенко, Т. Н. Платонова*

Показана информативность определения функционально неактивных форм протромбина с использованием пары тестов — экамулнового и тромбопластинового в диагностике функционального состояния печени при медикаментозном гепатите, что одновременно позволяет контролировать эффективность репаративного действия новых препаратов.

**DIAGNOSTICS AND CORRECTION
OF COAGULATION DISORDERS DURING
THE DRUG-INDUCED HEPATITIS**

*V. A. Gryshchenko, V. A. Tomchuk, O. M. Lytvynenko,
V. A. Chernyshenko, T. N. Platonova*

It was shown that studying functionally inactive forms of prothrombin using a combination of two tests, ecamulin and thromboplastin tests, to diagnose the liver's functional state during the drug-induced hepatitis is informative, and at same time allows to control the effectiveness of the reparative action of newly created drugs.



Дочірнє підприємство
**“СПЕКТАР-
Україна”**

установ, а також для обстеження немовлят. Широкі технічні можливості, гарантійний строк (4 роки), високі точності характеристик дозволили поставляти ці вироби в 46 країн світу.

Продукція має сертифікати якості ISO 9001, зареєстрована МОЗ України та дозволена до застосування в медичній практиці.

ДП «СПЕКТАР-Україна»
03680, Київ, вул. Боженко, 31, офіс 352. Тел./факс: 522-95-69, 502-68-10, 529-41-61.
ЗАПРОШУЄМО ДО СПІВРОБІТНИЦТВА ДІЛЕРІВ !!!

ДП «Спектар-Україна» пропонує вироби Сербського заводу Spektar — пластиковий лабораторний посуд, а також лабораторні аналізатори російського НВП «Техномедика».

Застосування пластикового лабораторного посуду — важливий крок до вдосконалення лабораторної медицини. Використання цієї продукції дозволяє більш точно виконувати лабораторні дослідження та уникати похибок як на доаналітичному, так і на аналітичному етапах.

Осlibivo рекомендовано застосування пластикового посуду для виконання: імунологічних, гормональних, гемостазіологічних досліджень, визначення мікроелементів. Застосування цієї продукції має найважливіше профілактичне значення при роботі з інфекційним або невідомим біоматеріалом.

Продукція НВП «Техномедика» — малі біохімічні аналізатори, портативні гемоглобінометри, нейназинні та безреагентні аналізатори білірубіну крові, призначенні для КДЛ міських та сільських