

группы наблюдался значительно реже (на 25 %) ($p < 0,05$), чем в группе сравнения. Вследствие этого можно предположить, что лечение по предложенной нами схеме будет способствовать снижению вероятности реализации мета-статического потенциала опухоли.

Также на основании исследования площади ядер и фактора формы в группах выявлены более выраженные дистрофические изменения ядер клеток опухолей в основной группе. На основании вышеизложенного можно предположить, что ВЛОК потенцирует цитотоксическое действие химиопрепаратов.

Заключение

Сочетанное использование гемолазеротерапии и НПХТ достоверно увеличивает объективный эффект лечения, ведет к повышению числа полных морфологических регрессий опухоли, проявляется выраженными дистрофическими изменениями ядер клеток опухоли в сравнении с применением только НПХТ. Применение предложенной комбинации неoadъювантного лечения, судя по выраженной лимфоидной инфильтрации и снижению отека стромы, вероятно, может способствовать снижению метастатического и инвазивного потенциала опухоли.

Непосредственные результаты клинического и морфологического исследования лечения пациенток с МРМЖ указывают на преимущества совместного применения НПХТ и ВЛОК и обосновывают применение данной методики в клинической онкологии. Существует необходимость в дальнейшем провести оценку результатов лечения с использованием данной методики в отдаленные сроки согласно

стандартным критериям наблюдения за пациентами с онкологическими заболеваниями.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Трапезников, Н. Н. Статистика рака молочной железы / Н. Н. Трапезников, Е. М. Аксель; под общ. ред. проф. Н. И. Переводчиковой. — В кн.: Новое в терапии рака молочной железы — М., 1998. — С. 6–10.
2. Global cancer statistics, 2002 / D. M. Parkin [et al.] // *CA Cancer J. Clin.* — 2005. — Vol. 23, № 7. — P. 74–108.
3. Кушлинский, Н. Е. Рак молочной железы / Н. Е. Кушлинский, С. М. Портной, К. П. Лактионова. — М.: Издательство РАМН, 2005. — 479 с.
4. Современные возможности и проблемы неoadъювантной лекарственной терапии при местно-распространенном раке молочной железы / М. Р. Личиницер [и др.] // *Российский онкологический журнал.* — 2001. — № 5. — С. 31–34.
5. Шаповал, Е. В. Роль химиотерапии в лечении раннего рака молочной железы // *Медицинские новости.* — 2009. — № 9. — С. 3–5.
6. Лекарственный патоморфоз как критерий оценки эффективности лечения и прогноза поверхностного рака мочевого пузыря / Е. А. Усьнин [и др.] // *Сибирский онкол. журн.* — 2002. — № 2. — С. 27–30.
7. Лечебный патоморфоз как критерий эффективности лечения и прогноза рака молочной железы / Е. М. Рошин [и др.] // *Медицинский альманах.* — 2010. — № 3 (12). — С. 48–53.
8. Гистологический метод количественной оценки степени лучевого повреждения опухоли / Г. А. Лавникова [и др.] // *Мед. радиология.* — 1978. — № 3. — С. 6–9.
9. Литвинова, Т. М. Квантовая гемотерапия как компонент лечения рака тела матки / Т. М. Литвинова // *Охрана материнства и детства.* — 2006. — № 1. — С. 10–15.
10. Применение лазерной терапии в предоперационном периоде у больных раком молочной железы / В. И. Тарутинов [и др.] // *Клин. хирургия.* — 1996. — № 1. — С. 31–34.
11. Зырянов, Б. Н. Низкоинтенсивная лазерная терапия в онкологии / Б. Н. Зырянов, В. А. Евтушенко, З. Д. Кицманюк; под ред. Б. Н. Зырянова. — Томск: STT, 1998. — 336 с.
12. Лавникова, Г. А. Некоторые закономерности лучевого патоморфоза опухолей человека и их практическое использование / Г. А. Лавникова // *Вестн. АМН СССР.* — 1976. — № 6. — С. 13–19.
13. Jass, J. R. Lymphocytic infiltration and survival in rectal cancer / J. R. Jass // *J. Clin. Pathol.* — 1986. — Vol. 39. — P. 585–589.
14. Significance of nuclear morphometry in cytological aspirates of breast masses / S. Kalhan [et al.] // *J. Cytol.* — 2010. — Vol. 27 (1). — P. 16–21.
15. Vascular permeability factor / vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy / H. F. Dvorak // *J. of Clin. Oncol.* — 2002 — Vol. 20, № 21. — P. 4368–4380.

Поступила 22.06.2012

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МЕДИЦИНА И БИОЛОГИЯ

УДК 534.23:547.963.4

ПРЕВРАЩЕНИЯ ФЕРРИПРОТОПОРФИРИНА IX ГЕМОГЛОБИНА В УЛЬТРАЗВУКОВОМ ПОЛЕ

В. А. Игнатенко, А. В. Лысенкова

Гомельский государственный медицинский университет

Действие ультразвука на гемоглобин (Hb) приводит к образованию мет-гемоглобина (метHb), который при дальнейшем воздействии доходит до глобина и билирубина. На наличие возможности образования билирубина указывает превращение феррипротопорфина IX с разрывом α -метеновой связи и последующим образованием СО и гидратированного электрона. С гемоглобином СО образует карбоксигемоглобин (карбоксиHb). Одновременно спирты в УЗ-поле способствуют образованию карбоксиHb и восстановлению метHb до дезоксигемоглобина (дезоксигемоглобин), а также при наличии гидратированного электрона — к увеличению концентрации супероксида, что приводит к увеличению количества радикалов кислорода и дальнейшему превращению гемоглобина.

Ключевые слова: феррипротопорфин IX, протопорфин IX, гемм, гемоглобин, Hb, УЗ поле, карбоксигемоглобин, метHb, спирты, радикалы кислорода, билирубин, супероксид, оксид углерода (II), водорода пероксид.

TRANSFORMATION OF IX HEMOGLOBIN FERRIPROTOPORFIRIN
IN AN ULTRASONIC FIELD

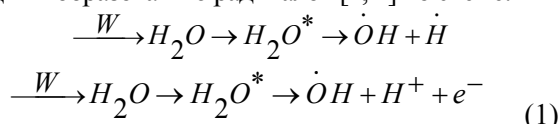
V. A. Ignatenko, A. V Lysenkova

Gomel State Medical University

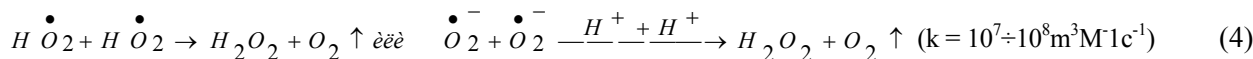
The effect of ultrasound on hemoglobin (Hb) leads to the formation of metHb that within the further exposure comes to globin and bilirubin. The transformation of ferriprotoporfirin IX with α -methene gap of relation and the subsequent formation of CO and hydrated electron points to the possibility of bilirubin formation. Carboxyhemoglobin together with CO forms hemoglobin. At the same time alcohols in the ultrasonic field contribute to the formation of carboxyhemoglobin and restoration of metHb to dezoksiHb, as well as the hydrated electron increases the concentration of superoxide, which leads to an increase in oxygen radicals and further conversion of hemoglobin.

Key words: ferriprotoporfirin IX, protoporphyrin IX, gems, hemoglobin, Hb, ultrasonic field, carboxyhemoglobin, metHb, alcohols, oxygen radicals, bilirubin, superoxide, carbon monoxide (II), hydrogen peroxide.

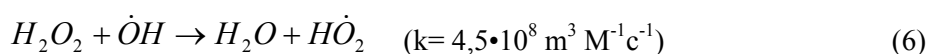
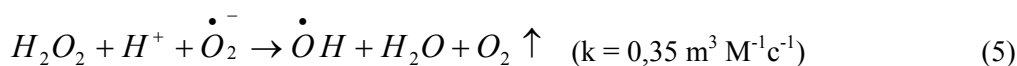
Известно, что распространяясь в среде, ультразвуковые волны оказывают на нее действие как носитель энергии. Поглощенная H_2O энергия приводит к образованию радикалов [1, 2] по схеме:



Образовавшийся электрон может взаимодействовать с водой, и тогда появляется гидратированный электрон, который может существовать в водной среде до 600 мс [3]. В этом случае при наличии в растворе молекул кислорода вероятен процесс образования супероксида по реакции:

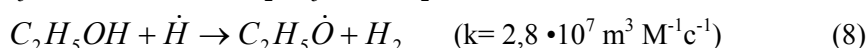
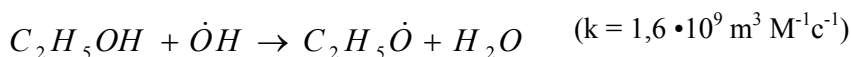


При взаимодействии с \dot{O}_2^- — водород пероксид может инактивироваться по схеме (5)

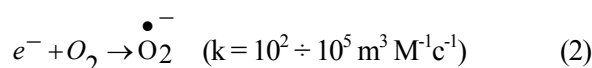


В работе [5] показаны превращения этилового спирта при взаимодействии со свободными радикалами. Известно, что радикалы H и OH взаимодействуют с молекулами этилового спирта с константами скорости $K = 2,8 \cdot 10^7$ и $K = 1,6 \cdot 10^9 \text{ м}^3 / (\text{кмоль} \cdot \text{с})$ соот-

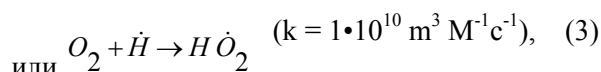
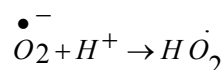
ветственно, а гидратированный электрон — с $K = 1 \cdot 10^5 \text{ м}^3 / (\text{кмоль} \cdot \text{с})$ [6] и с (определенной методом импульсного фотолиза) [7] $K = 4 \cdot 10^2 \text{ м}^3 / (\text{кмоль} \cdot \text{с})$. Рассмотренные радикалы взаимодействуют со спиртами по схеме (8):



В водном растворе C_2H_5OH под действием УЗ или УФ вследствие высокой упругости паров спирта взаимодействует с радикалами с образованием $C_2H_5\dot{O}$ радикала спирта. При этом в ультразвуковом поле при увеличении концентрации кислорода происходит его взаимодействие с альфа-



В свою очередь, \dot{O}_2^- взаимодействуя с H^+ , образует гидродиоксид:



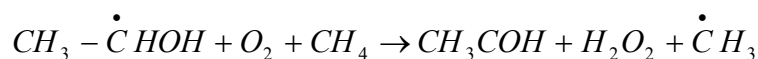
или $O_2 + \dot{H} \rightarrow H\dot{O}_2$ (3) которые взаимодействуя друг с другом, образуют водород пероксид [4].

образуя гидроксильный радикал OH , или с $\dot{O}H$, образуя супероксид $H\dot{O}_2$ (6)

гидроксиэтильным радикалом спирта с константой $K = 4,3 \times 10^9 \text{ м}^3 / (\text{кмоль} \cdot \text{с})$ [8] с последующим образованием уксусного альдегида, уксусной кислоты и водород пероксида, а также возможно взаимодействие радикалов спиртов с $H\dot{O}_2$ и $H\dot{O}_2$ или O_2 :

гидроксиэтильным радикалом спирта с константой $K = 4,3 \times 10^9 \text{ м}^3 / (\text{кмоль} \cdot \text{с})$ [8] с последующим образованием уксусного альдегида, уксусной кислоты и водород пероксида, а также возможно взаимодействие радикалов спиртов с $H\dot{O}_2$ и $H\dot{O}_2$ или O_2 :

гидроксиэтильным радикалом спирта с константой $K = 4,3 \times 10^9 \text{ м}^3 / (\text{кмоль} \cdot \text{с})$ [8] с последующим образованием уксусного альдегида, уксусной кислоты и водород пероксида, а также возможно взаимодействие радикалов спиртов с $H\dot{O}_2$ и $H\dot{O}_2$ или O_2 :



С увеличением концентрации кислорода выход уксусного альдегида возрастает.

В этом случае этанол выполняет роль «перехватчика» гидроксильных радикалов, и только через определенное время в системе образуется водород пероксид.

Рассмотрев кинетику образования радикалов и их взаимодействие со спиртами, можно предположить, что спирты являются хорошими «защитниками» сред от радикалов. Учитывая это, мы изучали превращения Нв гемоглобина при действии УЗ 880 кГц и интенсивностью 0,2–2,0 Вт/см².

Материалы и методы

В работе использованы: билирубин и сывороточный альбумин человека (САЧ) производства Reanal (ВНР); отечественные препараты 1,10-фенантролин, «ч.д.а»; сульфат железа (II), «ч.д.а»; феррицианид калия, «ч.д.а»; серная кислота, «х.ч»; щавелевая кислота, «х.ч»; гидросульфит натрия, «ч»; этанол, «ос.ч.»; метанол, «х.ч.»; ацетальдид, «ч»; свежеперегнанный 2,4-динитрофенилгидразин, «ч.д.а.»; радиоактивные соединения 1-(¹⁴C)-ацетальдегид с удельной радиоактивностью 1 мКи/мл, 1-(¹⁴C)-этанол и 2-(¹⁴C)-этанол с удельной радиоактивностью 104 мКи/мл.

ОксиНв получали из свежей донорской крови по описанному ранее методу [9]. Отмытые трижды 0,15 М раствором NaCl эритроциты подвергали осмотическому шоку в 0,01 М Na фосфатном буфере рН 7,2 с последующим центрифугированием при 16000 об/мин, для опытов брали супернатант, концентрация белка изменялась в пределах 10⁻⁴–10⁻⁵ М и определялась спектрофотометрически по экстинкции для λ = 415 нм. ε₄₁₅ = 125000 М⁻¹ см⁻¹.

МетНв получали добавлением к раствору оксиНв в воде или фосфатном буфере (0,015 М, рН 7,0) избытка феррицианида с последующим отделением низкомолекулярных соединений гель-фильтрацией на сефадексе G - 25. Пероксидную форму Нв получали добавлением избытка перекиси водорода к водному раствору метНв [10].

КарбоксиНв получали пропусканием через водный раствор оксиНв оксид углерода (II), который образовывался при добавлении серной кислоты к водному раствору муравьиной кислоты; дезоксиНв — добавлением к оксиНв гидросульфита натрия [11] или барботированием раствора оксиНв молекулярным азотом в течение 20 минут, а также понижением атмосферного давления [12]. АпоНв получали по методу Росси-Фанелли, обрабатывая Нв под-

кисленным ацетоном на холоде. Для защиты оксиНв от окисления кислородными свободными радикалами использовали цистеин, цистин, глутатион окисленный, глутатион восстановленный, сывороточный альбумин. Окисление серосодержащих соединений, содержащих S-S и -SH группы, до остатков цистеиновой кислоты контролировали на аминокислотном анализаторе.

В качестве ловушек радикалов ОН и Н использовали растворы спиртов, концентрация которых изменялась от 0,01 до 1 М.

В работе использовали ультразвуковые колебания частоты 880 кГц от ультразвукового терапевтического аппарата УТП-1 с изменяемой интенсивностью 0,2–2 Вт/см², получаемые с кварцевого излучателя диаметром 4 см. Растворы исследуемых веществ, подвергаемые действию ультразвуковых колебаний, помещали в стеклянный сосуд, закрывали и ставили на кварцевый излучатель ультразвуковой головки. Ультразвуковая головка помещалась в сосуд, через который циркулирует охлажденная вода, подаваемая насосом термостата U-10 для охлаждения излучателя и облучаемой пробы.

Концентрацию гема в растворе после воздействия УЗ на Нв определяли флуориметрическим методом. В 2 М растворе щавелевой кислоты инкубировали 4–10 мкг Нв (1 мл при 98–100 °С в течение 30 мин). Затем раствор охлаждали и измеряли интенсивность флуоресценции протопорфирина IX. Длина волны возбуждающего света λ = 406 нм. Максимум флуоресценции — при 613 нм. Концентрацию ионов двухвалентного железа — Fe (II), определяли спектрофотометрическим методом с использованием 1,10-фенантролина. Концентрацию комплекса катиона железа с фенантролином рассчитывали по значению коэффициента молярной экстинкции, равного 1,1·10⁴ М⁻¹·см⁻¹ для длины волны λ = 510 нм. Альдегиды, образовавшиеся при озвучивании водных растворов алифатических спиртов, определяли с помощью 2,4-динитрофинилгидразина [13]. К меченым 1-(¹⁴C) ацетальдегиду и 2-(¹⁴C) этанолу или 1-(¹⁴C)-этанолу добавляли не меченый ацетальдегид или этанол для создания соответствующих молярных избытков по отношению к белку. Количество включенного в состав макромолекулы меченого спирта или продуктов его сонолиза определяли после отделения белковых фракций методом гель-фильтрации на сефадексе G - 25.

Альдегиды, обратимо связанные с первичными аминокруппами белка с образованием осн

ным алкилированием NaBH_4 . Для этого озвученный водно-спиртовой раствор оксиHв или метHв обрабатывали NaBH_4 , затем проводили гельфильтрацию на сефадексе G – 25. Определяли радиоактивный счет в белковых фракциях, используя диоксанный сцинтиллятор [14] на радиоактивном счетчике «Magk – 2» (США).

Равновесные константы ассоциации алифатических спиртов определяли спектрофотометрически по уменьшению оптической плотности полосы поглощения метгемоглобина на 630 нм в зависимости от концентрации спиртов. Кислотный гидролиз проводили в течение 24 часов при 105 °С в 6 н. HCl. УФ-спектры поглощения записывали на регистрирующем спектрофотометре «Spesord M-40» (ГДР). Регистрацию флуоресценции осуществляли на спектрофлуориметре «Aminco Bowman» (США). Действие ультразвука на растворы ферро- и ферриформ Hв проводили в атмосфере воздуха N_2 , N_2O .

Результаты и их обсуждение

Воздействие УЗ на водный раствор оксиHв в атмосфере воздуха приводит к его окислению до метHв [15], что проявляется в УФ- и

видимой области спектра поглощения, кроме коротковолнового сдвига полосы Soret возникновением полосы с максимумом на 630 нм. Превращение оксиHв происходит количественно. Это подтверждается окислением оксиHв той же концентрации $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. Обработка раствора метHв, полученного окислением $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ или в УЗ поле, NaBH_4 приводит к образованию дезоксиHв, который после пропускания через раствор атмосферного воздуха превращается в оксиHв.

Кривые, характеризующие связывание кислорода с исходным Hв и гемоглобином, полученным после восстановления метHв NaBH_4 , образованного в ультразвуковом поле, практически совпадают (рисунок 1). Удовлетворительно совпадают и P_{50}O_2 исходного Hв и гемоглобина, полученного из метHв NaBH_4 . Как видно из рисунка 1, в начальный период озвучивания (3 мин) структура молекулы Hв по связыванию кислорода не нарушена и оксигенация протекает полностью. ДезоксиHв, а также карбоксиHв, полученный из оксиHв продуванием через водный раствор оксида углерода (II), под действием ультразвуковых колебаний быстро окисляются до метHв.

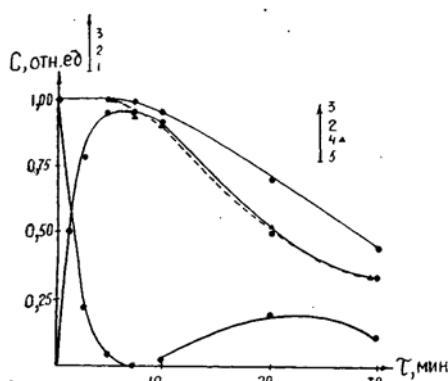


Рисунок 1 — Кинетика убыли оксиHв в УЗ-поле в атмосфере воздуха (1), образования метHв (2), деструкции гемина (3), образования оксиHв из метHв после восстановления NaBH_4 (4), дальнейшего превращения метHв (5) (разность между 3 и 4). Концентрация исходного оксиHв $1 \cdot 10^{-5}$ М, водный раствор, рН 7,0, C —измеряемая концентрация Hв и гемина, за единицу принята первоначальная концентрация оксиHв. Интенсивность УЗ - 2 Вт/см²

Дальнейшее воздействие УЗ на метHв приводит к образованию новой неустойчивой формы Hв, максимум поглощения полосы Soret которой сдвинут в длинноволновую область и отличается по положению максимумов от спектров поглощения оксиHв или карбоксиHв. Полученный спектр более похож на спектр поглощения метHв сразу после добавления водорода пероксида, когда образуется феррильная форма Hв (рисунок 2, кривые 2 и 3). Параллельно с более глубоким окислением феррионов наблюдается деструкция протопорфирина IX, освобождение ионов $\text{Fe}(\text{III})$, окисление сульфгидрильных групп остатков цистеина

до цистеиновой кислоты, а также окисление боковых остатков ароматических аминокислот.

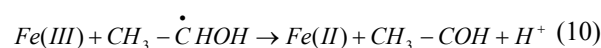
Добавление в водный раствор спиртов приводит к защитному эффекту, усиливающемуся с увеличением концентрации спиртов, серосодержащих соединений, а также белков, например, сывороточного альбумина, причем в последнем деструкции в основном подвергаются S-S связи. При достаточно высоких концентрациях спиртов оксиHв не окисляется в ультразвуковом поле за промежутки времени, в течение которых в отсутствие спиртов наблюдали полное превращение ферроHв в ферриHв. Причем добавление одинаковых моляр-

ных концентраций соединений ловушек вызвало повышение стабильности HbO_2 к окислению в УЗ-поле, которое хорошо коррелировало с константой скоростей взаимодействия OH радикалов с указанными спиртами [16].

Однако вследствие образования из спиртов оксида углерода (II) происходит быстрое превращение оксиHв в карбоксиHв. Количество образовавшейся окиси углерода мало, но, как известно, гемоглобин обладает в 200 раз более высоким сродством к CO , чем к O_2 [17].

При действии УЗ на белки в присутствии спиртов наблюдается включение спиртов или продуктов их сонолиза в состав макромолекулы.

Следует отметить, что количество альдегидов, образовавшихся в ультразвуковом поле в водно-спиртовых растворах оксиHв, достаточно высоко, но с аминок группами белка основания Шиффа образуют в равновесных условиях лишь небольшую часть альдегидов. В то же время такое же по длительности действие УЗ на водно-спиртовые растворы в отсутствие Hв сопровождается образованием следовых количеств альдегида. Поэтому можно предположить, что метHв, образовавшийся в ультразвуковом поле вследствие окисления ферроформ Hв, восстанавливается обратно в дезоксиHв радикалами спиртов в следующей реакции:



аналогичной реакции ионов Fe (III) в водно-спиртовых средах (рисунок 3, кривая 3).

Кинетическая кривая образования ионов Fe (III) при облучении ультразвуком водного раствора FeSO_4 в зависимости от мощности излучения близка по форме кинетической кривой окисления ферроHв в ферриHв. Симбатность хода кривых 1 и 2 на рисунке 3 свидетельствует, что окисление оксиHв в метHв протекает под действием свободных радикалов, образовавшихся вследствие расщепления молекул воды в присутствии атмосферного воздуха, а эффективность захвата радикалов OH свободными ионами железа и в комплексе с протопорфирином IX сравнимы между собой по порядку величин. Еще одним доказательством того, что оксиHв и карбоксиHв окисляются в метHв под действием свободных радикалов, служит защитный эффект спиртов, являющихся «перехватчиками» свободных радикалов.

При озвучивании метHв в смеси со спиртами как в атмосфере азота, так и воздуха наблюдается включение спиртов или их продуктов сонолиза в состав макромолекулы (рисунок 4).

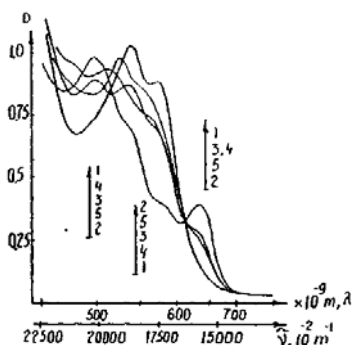


Рисунок 2 — Спектры поглощения растворов метгемоглобина: 1 — исходный метHв; 2 — метHв в присутствии H_2O_2 в начальный момент времени; 3 — то же после 3 часов инкубации; 4,5 — метHв после воздействия ультразвука в воде (4) и в присутствии десятипроцентного спирта (5). Концентрация белка $2 \cdot 10^{-5}$ м, интенсивность ультразвука 2 Вт/см^2 , время звучивания 40 мин, концентрация H_2O_2 — $0,3 \text{ М}$

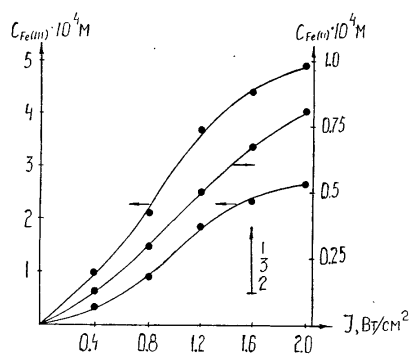


Рисунок 3 — Зависимости окисления ферроформ водного раствора закиси железа (1) и оксиHв (2) в ферриформы и восстановления ферри-ионов в ферроформу (3) радикалами этанола от интенсивности УЗ-поля. Кривая, характеризующая образование ацетальдегида, с точностью до 10 % совпадает с кривой 3. Кривые 1 и 2 получены в атмосфере воздуха, 3 — в атмосфере азота, в десятипроцентном водно-этанольном растворе. Время озвучивания растворов 5 мин. Концентрация ионов Fe (II) в составе оксиHв $5 \cdot 10^{-4}$ м, FeSO_4 $1 \cdot 10^{-3}$ м, этанола 2М, Na — фосфатный буфер, pH 6,8 (0,01 М)

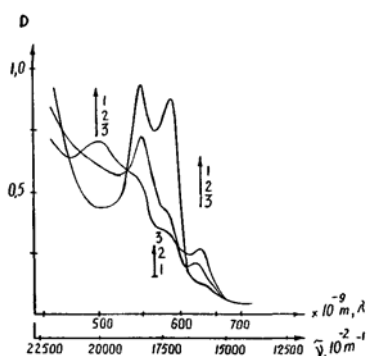


Рисунок 4 — Изменение спектров поглощения метНв при восстановлении ферриформы в ферроформу в атмосфере азота в ультразвуковом поле: 1 — исходный метНв; 2 — после воздействия УЗ; смесь ферро- и ферриформ; 3 — метНв в присутствии спиртов после воздействия УЗ, форма спектра соответствует карбоксиНв. Концентрация белка $2 \cdot 10^{-5}$ М, интенсивность ультразвука 2 Вт/см^2

Согласно [18], при радиоллизе и сонолизе спиртов наряду с другими продуктами деструкции образуются альдегиды, количество которых, измеряемое с помощью фенилгидразина, пропорционально времени озвучивания. Образовавшиеся альдегиды могут взаимодействовать с первичными амино- и SH-группами

остатков цистеина, формируя основания Шиффа и полумеркапталы. Количество включенных в состав гемоглобина продуктов сонолиза зависит от времени; инкубации озвученной смеси спирт-белок. Добавление в эту озвученную смесь NaBH_4 приводит к ковалентному связыванию альдегида с белком (рисунок 5).

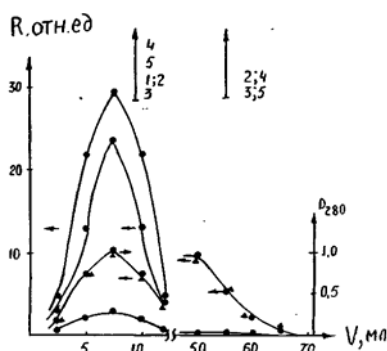
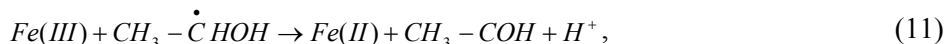


Рисунок 5 — Хроматографическое разделение на колонке с сефадексом G-50 раствора, содержащего гемоглобин и 2-(^{14}C)-этанол; 1 — поглощение на 280 нм белковой фракции исходного неозвученного гемоглобина; 2 — радиоактивность в белковых фракциях озвученного гемоглобина в смеси со спиртом; 3 — радиоактивность в гемоглобине, полученном из озвученного гемоглобина в смеси со спиртом; 4 — радиоактивность в белковых фракциях гемоглобина водно-спиртовых растворов после озвучивания и последующей обработки NaBH_4 ; 5 — радиоактивность в белковых фракциях глобина, полученного из гемоглобина с последующей обработкой NaBH_4

Продукты алкилирования первичных аминогрупп белка устойчивы к кислотному гидролизу и выходят в виде отдельного пика между пиками выхода гистидина и аргинина в спектре аминокислотного анализа. Добавление 1-(^{14}C)-ацетальдегида к гемоглобину с последующим восстановительным алкилированием NaBH_4 и кислотным гид-

ролизом дает такой же пик во времени удерживания в спектре аминокислотного анализа. Отделение гемина от белковой глобулы в кислой среде позволяет исключить вклад радиоактивности, связанной с включением в состав гемина меченой окиси углерода. Образовавшиеся радикалы спиртов восстанавливают метНв по следующему механизму:



причем эффективность восстановления метНв алифатическими спиртами возрастает с увеличением длины углеводородной цепочки (таблица 1). Алифатические спирты связываются с метНв в гидрофобном кармане со стороны шестого координационного положения железа

[19]. Это приводит к возрастанию эффективности восстановления метНв в ферроформу радикалами спиртов симбатно с увеличением сродства спиртов к метНв.

Под действием ультразвука из спиртов образуется оксид углерод (II), весьма эффективно

связывающийся с гемом ферроНв с образованием карбоксиНв (рисунок 2, кривая 5). Озвучивание 1-(¹⁴C)-этанола и 2-(¹⁴C)-этанола в смеси с метНв в атмосфере азота позволило установить, что меченая окись углерода обра-

зуется при деструкции обоих спиртов. Действительно, радиоактивность карбоксиНв, полученного при сонолизе метНв, в присутствии обоих спиртов, уменьшается после отделения гемина.

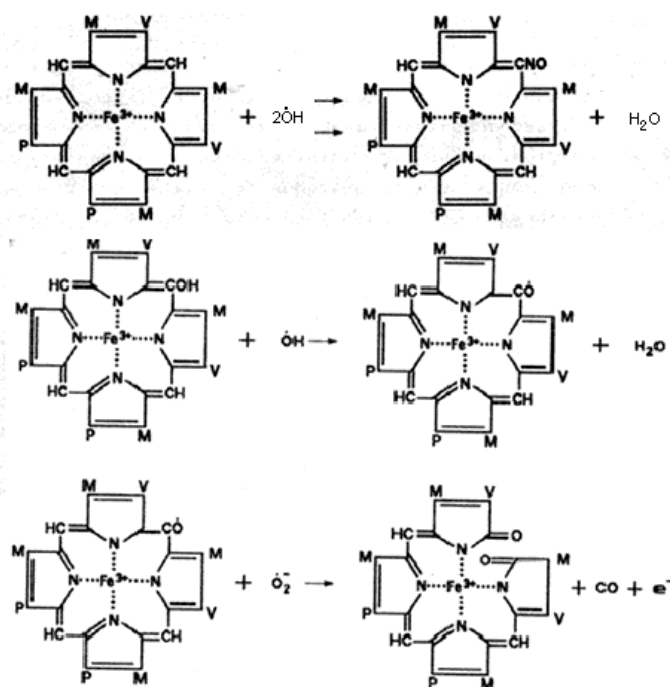
Таблица 1 — Образование карбоксиНв, содержащего Fe(II), в водно-спиртовых растворах метНв, содержащего Fe(III), под действием ультразвука в атмосфере азота.

Метанол CH ₃ OH		Этанол C ₂ H ₅ OH	
C ₁ -концентрация спирта (М)	C ₂ - % образования карбоксигемоглобина	C ₁ - концентрация спирта (М)	C ₂ - % образования карбоксигемоглобина
0,024	12,5	0,017	32
0,122	19,5	0,086	70
0,244	24,0	0,172	72
—	—	1,700	100

Примечание. В последнем опыте время действия ультразвука интенсивностью 1,6 Вт/см² на раствор метНв со спиртом 30 мин, в предыдущих — 10 мин. Концентрация исходного метНв принята за 100 %; C₁ — концентрация спирта в растворе метНв, C₂ — количество карбоксиНв, образовавшегося из метНв.

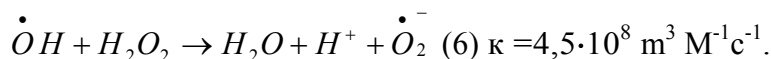
Наряду с образованием СО при облучении спиртов возможно образование СО при взаи-

модействии радикалов с α-метеновым мостиком феррипротопорфирина IX по схеме



Вышеприведенная схема возможна при наличии в реакционной смеси супероксид ра-

дикала, который образуется при взаимодействии с гидроксильным радикалом



Образовавшийся СО переводит Нв в карбоксигемоглобин, а дальнейшее превращение гемма приводит к образованию билирубина, что наблюдалось в эксперименте.

Заключение

Действие ультразвука на Нв приводит к образованию метНв, который при дальнейшем воздействии доходит до глобина и билирубина.

На наличие возможности образования билирубина указывает превращение феррипротопорфирина IX с разрывом α-метеновой связи и последующим образованием СО и гидратированного электрона. С гемоглобином СО образует карбоксигемоглобин. Одновременно спирты в УЗ-поле способствуют образованию карбоксиНв и восстановлению метНв до дезоксиНв, а также

при наличии гидратированного электрона увеличению концентрации супероксида, что приводит к увеличению количества радикалов кислорода и дальнейшему превращению гемоглобина.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Маргулис, М. А. Звукохимические реакции и сонолюминесценция / М. А. Маргулис. — М., 1986. — С. 260.
2. Маргулис, М. А. Основы звукохимии / М. А. Маргулис. — М.: Химия, 1984. 260 с.
3. Маргулис, М. А. О механизме многопузырьковой сонолюминесценции / М. А. Маргулис // Журнал физической химии. — 2006. — Т. 80, № 10. — С. 1908–1913.
4. Химия и ультразвук / Под ред. А. С. Козьмина. — М.: Мир, 1993. — С. 560.
5. Freeman, G. R. Radiation chemistry of ethanol: A review of data on yields, reactions rates parameters and spectral properties of transients / G. R. Freeman // NSRDS-NBS. — 1974. — № 48. — P. 56.
6. Hart, E. T. A review of the radiation chemistry of the hydrated electron in aqueous solution / E. T. Hart, J. K. Thomas, S. A. Gordon. — Radiat. Res. — 1964. — Vol. 21, № 4. — P. 74–87.
7. Anbar, M. Selected specific rates of transients from water in aqueous solution / M. Anbar, M. B. A. Ross // Hydrated electron. — NSRDS-NBS. — 1973. — № 43. — P. 1–59.
8. Adams, G. E. Pulse radiolysis studies on the oxidation of organic radicals in aqueous solution / G. E. Adams, R. L. Willson // Trans. Faraday Soc. — 1969. — Vol. 65, № 9. — P. 2981–2987.
9. Affinity labeling of the polyphosphate binding site of hemoglobin / R. E. Benesch [et al.] // Biochemistry. — 1972. — Vol. 11, № 19. — P. 3576–3582.
10. Kawanishi, S. Mehariism to electron transfer to coordinated. Dioxygen of oxyhemoglobins to yield peroxide and methemoglobin / S. Kawanishi, W. S. Caughey // Biol. Chem. — 1985. — Vol. 260, № 8. — P. 4622–4631.
11. Van Kampen, E. J. Spectrophotometry of hemoglobin and hemoglobin derivatives / E. J. Van Kampen, W. G. Zijlstra // Adv. Cl in. Chem. — 1983. — Vol. 23. — P. 199–257.
12. Изучение ультразвукового гемолиза эритроцитов в норме и при патологии / Ф. И. Брагинская // Биофизика. — 1982. — Т. 27, № 4. — С. 679–683.
13. Коренман, И. М. Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений / И. М. Коренман. — М.: Химия, 1975.
14. Степура, И. И. Взаимодействие ацетальдегида с сывороточным альбумином / И. И. Степура, И. Б. Заводник, Ю. М. Островский // Укр. биохим. журн. — 1982. — Т. 54, № 2. — С. 123–128.
15. Действие ультразвука на ферро-формы гемоглобина человека / В. А. Игнатенко [и др.] // Журнал физической химии. — 1988. — Т. LXII, № 9. — С. 2468–2476.
16. Шарпатый, В. А. Радиационная химия биополимеров / В. А. Шарпатый. — М.: Энерго-мздат, 1981. — С. 167.
17. Основы биохимии / А. Уайт [и др.]. — М.: Мир, 1981. — Т. 3. — С. 1878.
18. Фридович, И. Радикалы кислорода, пероксид водорода и токсичность кислорода. В кн.: Свободные радикалы в биологии / И. Фридович. — М.: Мир, 1979. — Т. 1. — С. 272–300.
19. Плюгачева, Е. И. Окисление алифатических спиртов гидроперекисями при участии гемопротеидов: дис. ... к.х.н. / Е. И. Плюгачева. — Минск, 1988. — С. 218.

Поступила 08.06.2012

УДК 616.37-002.191:611.013.395:612.434'73

ВЛИЯНИЕ ОКСИТОЦИНА НА РЕОРГАНИЗАЦИЮ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ СТЕНКИ ПСЕВДОКИСТЫ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

С. В. Дорошкевич

Гомельский государственный медицинский университет

Цель. Оценить воздействие окситоцина на реорганизацию соединительной ткани стенки псевдокисты поджелудочной железы после ее опорожнения путем пункционной аспирации.

Материалы и методы. Экспериментальное исследование выполнено на 62 белых крысах. Моделирование псевдокисты поджелудочной железы производили с помощью криохирургического комплекса КСН 3А/В. Пункционное аспирирование содержимого псевдокисты выполняли на 14 сутки после криовоздействия с введением в ее полость 1 МЕ окситоцина. Производилось гистологическое исследование с использованием морфометрии. Оценивались изменения морфометрических параметров псевдокисты поджелудочной железы и количественное содержание нейтрофильных лейкоцитов, лимфоцитов, макрофагов и фибробластов.

Результаты. Применение окситоцина привело к увеличению численности макрофагов и фибробластов и к уменьшению нейтрофильных лейкоцитов с третьих суток, а лимфоцитов — с 7 суток эксперимента. Отмечалось прогрессивное уменьшение размеров псевдокисты, которое завершилось ее инволюцией.

Заключение. Местное использование окситоцина при пункционной аспирации содержимого псевдокисты заметно стимулирует пролиферацию макрофагов с фибробластами и вызывает полную инволюцию псевдокисты поджелудочной железы.

Ключевые слова: соединительная ткань, окситоцин, псевдокиста поджелудочной железы, эксперимент.

INFLUENCE OF OXYTOCIN ON THE REORGANIZATION OF THE CONNECTIVE TISSUE OF THE PANCREATIC PSEUDOCYST WALL

S. V. Doroshkevich

Gomel State Medical University

Objective. To estimate the influence of oxytocin on the reorganization of the connective tissue of the pancreatic pseudocyst wall after its emptying by punctural aspiration.

Materials and methods. The experimental research was performed on 62 white rats. The pseudocyst of the pancreas was modeled with help of cryosurgical complex KCH 3A/B. The punctural aspiration of the contents of the pseudocyst was carried out on the fourteenth day after the cryoexposure with introduction 1 I.U. of oxytocin in its cavity.

Histological research was performed with use of morphometry. The changes in the morphometric parameters of the pancreatic pseudocyst and quantitative contents of neutrophils, lymphocytes, macrophages and fibroblasts were estimated.

Results. The application of oxytocin led to increased numbers of macrophages and fibroblasts and reduction of neutrophiled leucocytes starting from the third day and lymphocytes from the seventh day of the experiment. The study revealed the progressive reduction the sizes of the pseudocyst which ended in its involution.

Conclusion. The local use of oxytocin in the punctural aspiration of the pseudocyst contents significantly stimulates proliferation of fibroblasts and macrophages and causes complete involution of the pseudocyst of the pancreas.

Key words: connective tissue, oxytocin, pseudocyst of pancreas, experiment.