3. *Increase* of bradykinin-stimulated arachidonic acid release in delta F508 cystic fibrosis ephitelial cell line / R. Levistre, M. Lemnaouar, T. Rybkine, G. Bezeziat et al. // Biochimica et Biophysica Acta. — 1993. — Vol. 1181 (3). — P. 233-239.

4. *Меньшикова Е. Б., Зенков И. К.* Антиоксиданты и ингибиторы радикальных окислительных процессов // Усп. совр. биохимии. — 1993. — Т. 113, вып. 4. — С. 422-455.

5. *Шанин Ю. Н., Шанин В. Ю., Зиновьев Е. В.* Антиоксидантная терапия в клинической практике (теоретическое обоснование и стратегия поведения). — СПб.: ЭЛБИ, 2003. — 128 с.

6. *Clinical* pharmacology of pancreatic enzymes in patients with cystic fibrosis and in vitro performance of microencapsulated formulations / M. Kraisinger, J. Hochhans, A. Stecenko et al. // J. of Clinical Pharmacology. — 1994. — Vol. 34. — N 2. — P. 158-166.

7. *Руководство* по клинической лабораторной диагностике / Под ред. В. В. Меньшикова. — М.: Медицина, 1982. — 576 с.

8. *Misra H. P., Fridovich J.* // J. Biol. Chem. — 1972. — Vol. 247. — P. 3170-3172.

9. *Стальная И. Д., Гаришвили Т. Г.* Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Соврем. методы биохимии / Под ред. В. Н. Ореховича. — М.: Медицина, 1977. — С. 68-69.

УДК 616-008.6:575.222.22-053.5/.6:612.461.25:577.121.7

О. Г. Шаповалов

МОЖЛИВА АНТИОКСИДАНТНА РОЛЬ СЕЧОВОЇ КИСЛОТИ У ДІТЕЙ, ХВОРИХ НА МУКОВІСЦИДОЗ

Для встановлення можливої антиоксидантної ролі сечової кислоти (СК) досліджувались її концентрації у сироватці крові та їх кореляції з деякими показниками стану перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) — малоновим діальдегідом (МДА) крові, супероксиддисмутазою (СОД) еритроцитів у 50 дітей, хворих на муковісцидоз (МВ), та у 23 здорових дітей контрольної групи.

У групі дітей із МВ виявлено значне зростання рівнів СК у сироватці крові, корелюючих зі ступенем тяжкості гіпоксії на фоні тенденції до зниження активності СОД еритроцитів і вірогідної редукції плазмових концентрацій МДА, що може свідчити про наявність компенсаторного компонента гіперурикемії, спрямованого на заміщення функціональної недостатності деяких порушених ланок антиоксидантної системи.

Ключові слова: муковісцидоз, сечова кислота, перекисне окиснення ліпідів.

UDC 616-008.6:575.222.22-053.5/.6:612.461.25:577.121.7

O. G. Shapovalov

POSSIBLE ANTIOXIDATIVE ROLE OF URIC ACID IN CYSTIC FIBROSIS CHILDREN

To clear up the question concerning a possible role of uric acid (UA), its serum concentrations along with the certain indicators of lipid peroxidation status blood malonic dialdegidum (MDA) and erythrocytes superoxiddismutasa (SOD) were investigated in 50 CF and 23 healthy children.

There was revealed a significant elevation of UA serum levels with strong correlation with hypoxia markers severity on background of tendency to the decrease of SOD activity in combination with considerable reduction of MDA plasma concentrations.

The obtained data allow to make a conclusion about possible compensatory hyperuricemic component existence, directed to replacement of functional insufficiency of the definite impaired links of antioxidative system in hypoxic conditions.

Key words: cystic fibrosis, uric acid, lipid peroxidation.

УДК 612.017:547.367:577.115.4

Л. В. Юрлова, Н. В. Костюшова, І. І. Бокал, В. О. Ратушненко

СТАН ТІОЛ-ДИСУЛЬФІДНОЇ СИСТЕМИ ПРИ БІЛОК-БІЛКОВИХ ВЗАЄМОДІЯХ В ІМУННИХ І НЕІМУННИХ РЕАКЦІЯХ *IN VITRO*

Одеський державний медичний університет

Згідно з даними літератури, формування деяких фізіологічних і патологічних процесів тісно пов'язане з окисно-відновними перетвореннями сульфгідрильних (-SH-) і дисульфідних (-S-S-) груп білків і низькомолекулярних сполук, які зараховують до компонентів так званої тіол-дисульфідної окисно-відновної системи (ТДС) [1]. Причому на метаболічному рівні цю систему розглядають як «критичну», оскільки від її збалансованого функціонування залежить захист біомолекул від окиснювальної модифікації, особливо за надмірної інтенсифікації вільнорадикальних процесів і перекисного окиснення ліпідів [1–3].

До імунних феноменів, які мають важливу діагностичну цінність, зараховують появу тих чи інших антитіл. Вони, як і інші білки, мають унікальну макроструктуру, просторово організовані та здатні до самоорганізації. Причому ключові біологічні властивості тих чи інших антитіл безпосередньо пов'язані з їх структур-

но-конформаційними перебудовами при антигенному навантаженні. Ці процеси, як правило, супроводжуються зміною окисно-відновних перетворень -SH- і -S-S-груп білків і небілкових сполук [4]. Проте в літературі недостатньо висвітлені питання щодо стану компонентів тіол-дисульфідної системи при білок-білкових взаємодіях в імунних і неімунних реакціях.

Мета роботи — обгрунтувати загальні закономірності й особливості зміни окисно-відновних перетворень білкових і небілкових -SH- і -S-S-груп у модельних імунних і неімунних реакціях *in vitro* зі стандартними антигенами й антитілами з діагностичних тест-систем.

Матеріали та методи дослідження

Постановку імунних і неімунних реакцій здійснювали в модельних дослідах із стандартними антигенами і антитілами з діагностичних тест-систем "Sanofi Diagnostics Pasteur" (Франція) і KONE C (Фінляндія). Як антитіла використовували позитивні контрольні сироватки (ПКС), що містять антитіла до вірусу гепатиту С (ПКС~anti HCV), антитіла до Chlamydia trachomatis (ПКС~anti Chlamy) й імуноглобуліни класу G (ПКС~IgG). Крім того, використовували негативні контрольні сироватки (НКС), в яких не було антитіл до вірусу гепатиту С (НКС~non anti HCV). Як антигени брали сорбовані в ямках імунологічних планшетів рекомбінантні антигени вірусу гепатиту С (Ag HCV) і моноспецифічні сироватки проти імуноглобулінів класу G (МСС anti IgG).

Проведено чотири серії модельних дослідів. Моделлю імунного ушкодження обрано реакції антиген — антитіло (інфекційна та неінфекційна моделі), при яких взаємодіючі антитіла й антигени відповідали один одному за структурною комплементарністю. В інфекційній моделі (перша серія — 20 досліджень) обрана ПКС~anti HCV, яку додавали в ямки імунологічного планшета з сорбованими Ag HCV. У неінфекційній моделі (друга серія — 33 дослідження) використовували ПКС~IgG, яку сполучали з МСС anti IgG. Як негативний контроль (третя серія — 16 досліджень) використовували НКС~non anti HCV, додавали її в ямки імунологічного планшета з сорбованими Ag HCV. У четвертій серії (16 досліджень) до складу реакційних сумішей увійшли антитіла й антигени, які за структурною комплементарністю не відповідали один одному. Для цього використовували ПКС~anti Chlamy, додаючи її в ямки імунологічного планшета з сорбованими Ag HCV.

Підготовку реакційних сумішей усіх серій досліджень здійснювали методом, описаним у роботі [4]. Для цього в ямки імунологічних планшетів із сорбованими антигенами вносили по 225 мкл ПКС і НКС, після чого їх термостатували при температурі 37 °С протягом 60 хв. Вміст -SH- і -S-S-груп визначали в білковій і небілковій фракції імунних реакцій (ПКС~anti HCV + Ag HCV, ПКС~IgG + МСС anti IgG) і неімунних реакцій (НКС~non anti HCV+ Ag HCV і ПКС~anti Chlamy + Ag HCV). Небілкову фракцію одержували шляхом осадження білків розчином метафосфорної кислоти. Для цього відбирали в окремі пробірки по 200 мкл досліджуваного біоматеріалу, додавали метафосфорну кислоту (по 100 мкл — 5%-ну), центрифугували при 3000 об/хв протягом 30 хв і одержували прозорі супернатанти — небілкову фракцію.

Наявність інфекційних антитіл у ПКС або їх відсутність у НКС підтверджували загальноприйнятим методом ІФА, а кількість імуноглобуліну класу G у ПКС уточнювали методом імунотурбідиметрії. Вказані дослідження проводили згідно з інструкціями до тест-систем. Фотометрію здійснювали на багатоканальному вертикальному фотометрі LP 400, "Sanofi Pasteur" (Франція).

Про стан тіолдисульфідної окисно-відновної системи ПКС і НКС до й після антигенного навантаження робили висновки за зміною вмісту -SH- і -S-S-груп у білковій і небілковій фракціях, а також за білковим і небілковим тіол-дисульфідним (SH/SS) окисно-відновним (ox/red) коефіцієнтом (SH/SS ox/red коефіцієнт). Детекцію -SH- і -S-S-груп проводили методом зворотного амперометричного титрування розчином азотнокислого срібла [5] в модифікації [1]. За відношенням між кількістю -SH- і -S-S-груп розраховували SH/SS ox/red коефіцієнт [1], за яким робили висновки про зсув окисно-відновних перетворень компонентів ТДС у бік відновлених (-SH-) або окиснених (-S-S-) форм тіолів. Дослідження вказаних аналітів проводили на приладі для амперометричного титрування (виробництво «Химлаборприбор», Росія).

Результати дослідження та їх обговорення

Згідно з даними табл. 1, до антигенного навантаження в ПКС і НКС виявлено тільки небілкові -S-S-групи. Тому початковий рівень небілкового SH/SS ox/red коефіцієнта у ПКС і НКС дорівнював нулю. Після з'єднання ПКС і НКС з антигенами почали визначатися вільні небілкові -SH-групи, але тільки в імунних реакціях (ПКС~anti HCV + Ag HCV і ПКС~IgG + МСС anti IgG). У неімунних реакціях (НКС~non anti HCV + Ag HCV і ПКС~anti Chlamy + Ag HCV) небілкові -SH-групи були відсутні. Водночас в імунних реакціях (ПКС~anti HCV + Ag

Таблиця 1

Вміст небілкових -SH- і -S-S-груп у контрольних сироватках до і після антигенного навантаження, M±m

Досліджуваний біоматеріал	Небілкові -SH-групи, мкмоль/л	Небілкові -S-S-групи, мкмоль/л	Небілковий SH/SS ox/red коефіцієнт (абс.)
ПКС~anti HCV, n=20	0,0	31,5±1,3	0,0
ПКС~anti HCV + Ag HCV, n=20	26,1±1,4	13,4±0,2*	1,9±0,1
ПКС~IgG, n=33	0,0	15,9±2,1	0,0
ПКС~IgG + anti IgG, n=33	15,8±1,1	4,3±0,5*	3,9±0,3
НКС non anti HCV, n=16	0,0	81,9±1,2	0,0
НКС non anti HCV + Ag HCV, n=16	0,0	95,3±1,5*	0,0
ПКС~anti Chlamy, n=16	0,0	43,4±5,5	0,0
ПКС~anti Chlamy + Ag HCV, n=16	0,0	48,2±6,1**	0,0

Примітка. У табл. 1 і 2: * — статистично вірогідно порівняно з вмістом до антигенного навантаження (P<0,05); ** — статистично невірогідно порівняно з вмістом до антигенного навантаження (P>0,05).

Таблиця 2

Вміст білкових -SH- і -S-S-груп у контрольних сироватках до і після антигенного навантаження, M±m

Досліджуваний біоматеріал	Білкові -SH-групи, мкмоль/л	Білкові -S-S-групи, мкмоль/л	Білковий SH/SS ox/red коефіцієнт (абс.)
ПКС~anti HCV, n=20	338,4±6,7	82,2±3,3	4,2±0,2
ПКС~anti HCV + Ag HCV, n=20	187,2±5,6*	205,3±13,4*	0,9±0,1*
ПКС~IgG, n=33	178,9±15,4	132,3±8,2	1,3±0,1
ПКС~IgG + anti IgG, n=33	194,4±13,7**	131,8±13,1**	1,6±0,2*
НКС non anti HCV, n=16	484,0±5,5	72,4±11,2	7,5±0,1
НКС non anti HCV + Ag HCV, n=16	300,5±35,1*	134,9±30,1*	2,9±0,9*
ПКС~anti Chlamy, n=16	378,3±6,8	113,4±14,3	3,6±0,1
ПКС~anti Chlamy + Ag HCV, n=16	359,6±46,6**	83,1±14,8*	4,8±0,9*

HCV і ПКС~IgG + MCC anti IgG) було наявне зниження, а в неімунних реакціях (НКС~non anti HCV+ Ag HCV і ПКС~anti Chlamy + Ag HCV) — підвищення концентрації небілкових -S-S-груп порівняно з їх початковим вмістом у ПКС~anti HCV, ПКС~IgG, НКС~non anti HCV і ПКС~anti Chlamy до антигенного навантаження. Небілковий SH/SS ox/red коефіцієнт в імунних реакціях (ПКС~anti HCV + Ag HCV і ПКС~IgG + MCC anti IgG) став вищим за нуль порівняно з аналогічним коефіцієнтом ПКС~anti HCV і ПКС~IgG до антигенного навантаження. Небілковий SH/SS ox/red коефіцієнт у неімунних реакціях (НКС~non anti HCV+ Ag HCV і ПКС~anti Chlamy + Ag HCV) дорівнював нулю і не відрізнявся від початкових значень аналогічного коефіцієнта в НКС~non anti HCV і в ПКС~anti Chlamy до антигенного навантаження.

Згідно з даними табл. 2, до антигенного навантаження в ПКС і НКС були знайдені як білкові -SH-, так і білкові -S-S-групи. Тому початковий рівень білкового SH/SS ox/red коефіцієнта в ПКС і НКС був вищим за нуль. Вміст білкових -SH-груп підвищувався в реакційній суміші ПКС~IgG + MCC anti IgG і знижувався в реакційних сумішах ПКС~anti HCV + Ag HCV, НКС~non anti HCV+ Ag HCV і ПКС~anti Chlamy + Ag HCV порівняно з аналогічним показником у ПКС і НКС до їх антигенного навантаження. Вміст білкових -S-S-груп знижувався в реакційних сумішах ПКС~IgG + MCC anti IgG і ПКС~anti Chlamy + Ag HCV і підвищувався в реакційних сумішах ПКС~anti HCV + Ag HCV, НКС~non anti HCV+ Ag HCV порівняно з аналогічним показником у ПКС і НКС до їх антигенного навантаження. Білковий SH/SS ox/red коефіцієнт реакційних сумішей ПКС~IgG + MCC anti IgG і ПКС~anti Chlamy + Ag HCV став вищим, а в реакційних сумішах ПКС~anti HCV + Ag HCV і НКС~non anti HCV+ Ag HCV — нижчим порівняно з аналогічним коефіцієнтом у ПКС і НКС до їх антигенного навантаження.

Отже, виявлені загальні закономірності й особливості зміни окисно-відновних перетворень білкових і небілкових -SH- і -S-S-груп у модельних імунних і неімунних реакціях *in vitro*, вочевидь, опосередковуються структурно-конформаційними перебудовами білкових молекул у відповідь на навантаження їх тим чи іншим антигеном. Відомо, що ці процеси зазвичай супроводжуються супровідними реакціями тіолдисульфідної системи — це «маскування» або «демаскування» -SH-груп, утворення внутрішньо- і міжмолекулярних -S-S-зв'язків [6]. Причому

при відновленні змішаних -S-S- зв'язків між низькомолекулярними тіолами і білком може відбуватися вивільнення небілкових -SH-груп [6].

Відсутність вільних небілкових -SH-груп у ПКС і НКС до антигенного навантаження можна пояснити тим, що низькомолекулярні сполуки, які містять -SH-групи, як правило, перебувають у депонованому стані й кон'юговані з білками за рахунок утворення з ними змішаних дисульфідних зв'язків [7]. Проте поява вільних небілкових -SH-груп усе ж таки спостерігається, але тільки при високоспецифічній взаємодії в імунних реакціях антиген — антитіло. Тобто цей феномен з'являється за умови, якщо структурна комплементарність рецепторної зони антитіл відповідає антигенним детермінантам. Мабуть, тільки за таких умов зміна макроструктури білків і їх конформаційні переходи можуть супроводжуватися розривом і відновленням змішаних дисульфідних зв'язків між білком і низькомолекулярними сполуками, що містять -SH-групи. Тому знайдені особливості окисно-відновних перетворень небілкових -SH- і -S-S-груп при білок-білкових взаємодіях в імунних реакціях можуть побічно характеризувати специфічну імунобіохімічну фазу цих реакцій при формуванні імунної відповіді. Ці та інші окисно-відновні перетворення білкових -SH- і -S-S-груп в імунних і в неімунних реакціях, мабуть, свідчать про неспецифічні зміни структурно-функціонального стану взаємодіючих біомолекул.

Біологічне значення зміни вмісту -SH- і -S-S-груп в імунних і неімунних реакціях полягає в тому, що ці функціональні групи відіграють важливу роль у структурно-функціональній організації білкових молекул та ієрархії їх структурних рівнів. Виключно висока реакційна здатність -SH-груп робить можливою їхню участь в окисно-відновних перетвореннях, під час яких вони легко окиснюються, як правило, до дисульфідних угруповань, які, в свою чергу, знову регенерують при їх відновному розщеплюванні [1]. Оборотна тіолдисульфідна система, що виникає на основі цих перетворень, має істотне значення для регуляції окисно-відновної рівноваги у клітинах і тканинах організму, з нею пов'язані механізми багатьох біологічних і фізіологічних процесів. Тому можна припустити, що антигени за рахунок модифікації -SH- і -S-S-груп можуть впливати на залежні від цих функціональних груп біохімічні та фізіологічні процеси [1; 6].

В еволюційному аспекті слід зазначити, що без сірки у білках були б неможливими виникнення, існування і самопідтримання структурної цілісності, а також різних біологічних властивостей білкових тіл, тобто основи життя біологічного світу природи.

Вважаємо, що разом із визначенням антитіл традиційними імунологічними методами доцільно додатково вивчати особливості та загальні закономірності окисно-відновних перетворень білкових і небілкових -SH- і -S-S-груп в імунних і неімунних реакціях, що істотно розширює аналітичні та діагностичні можливості сучасного імуноаналізу.

Висновки

1. Виявлено загальні закономірності й особливості зміни вмісту білкових і небілкових -SH- і -S-S-груп у модельних імунних і неімунних реакціях *in vitro* зі стандартними антигенами й антитілами з діагностичних тест-систем.

2. Встановлено, що тільки імунні реакції антиген — антитіло супроводжуються вивільненням небілкових -SH-груп, зниженням вмісту небілкових -S-S-груп, а також підвищенням небілкового SH/SS ox/red коефіцієнта порівняно з початковими значеннями цих показників у позитивних контрольних сироватках до антигенного навантаження.

3. Знайдено модифікаційні зміни вмісту білкових -SH- і -S-S-груп, величин білкового SH/SS ox/red коефіцієнта при імунних і неімунних реакціях порівняно з початковими значеннями цих показників у позитивних і негативних контрольних сироватках до їх антигенного навантаження.

4. Разом із визначенням антитіл загальноприйнятими імунологічними методами доцільно в імунних реакціях антиген — антитіло додатково вивчати вміст білкових і небілкових -SH- і -S-S-груп, що істотно розширює аналітичні та діагностичні можливості сучасного імуноаналізу.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Соколовский В. В.* Тиолдисульфидное соотношение крови как показатель состояния неспецифической резистентности организма. — СПб.: Медицинская академия последипломного образования, 1996. — 33 с.

2. *Мещишен І. Ф., Григор'єва Н. П.* Глутатіонова система організму за норми та патології // Укр. біохім. журнал. — 2002. — Т. 74, № 4а. — С. 103.

3. *Каліман В. А.* Оксидативний стрес і регуляція метаболізму в екстремальних умовах // Укр. біохім. журнал. — 2002. — Т. 74, № 4а. — С. 9.

4. *Патент* 22989 A UA, МПК G 01 N 27/26 G 01 N 33/68 Спосіб визначення специфічності біологічної реакції антиген-антитіло / В. В. Костюшов, Л. А. Костюшова, О. Л. Тимчишин, В. В. Морозкін. — № 97052536; Заявл. 30.05.97; Опубл. 05.05.98.

5. *Kolthoff I. M., Harris W. E.* Ampermetric Titration of Mercaptan with silver nitrate Using the Rotating Platinum Electrode // Ind. Eng. chem. Anal. — 1946. — № 3. — P. 161-162.

6. *Можаев В. В., Мартинек К.* Инактивация и реактивация белков (ферментов) // Молекулярная биология. — 1982. — Т. 16, вып. 4. — С. 676-694.

7. *Friedman M.* Chemistri and biochemistre of sulfhidril group in aminoacides peptides and proteins. — Oxford; N. Y.: Pergamon Press, 1973. — P. 235.

УДК 612.017:547.367:577.115.4

Л. В. Юрлова, Н. В. Костюшова, І. І. Бокал, В. О. Ратушненко

СТАН ТІОЛ-ДИСУЛЬФІДНОЇ СИСТЕМИ ПРИ БІЛОК-БІЛКОВИХ ВЗАЄМОДІЯХ В ІМУННИХ І НЕІМУННИХ РЕАКЦІЯХ *IN VITRO*

У роботі вивчено особливості та загальні закономірності зміни вмісту білкових і небілкових -SH- і -S-S-груп у модельних імунних і неімунних реакціях *in vitro* з стандартними антигенами й антитілами з діагностичних тест-систем. Автори вважають, що разом із визначенням антитіл загальноприйнятими імунологічними методами доцільно додатково вивчати вміст білкових і небілкових -SH- і -S-S-груп в імунних і неімунних реакціях, що істотно розширює аналітичні та діагностичні можливості сучасного імуноаналізу.

Ключові слова: тіол-дисульфідна система, -SH- і -S-S-групи, імунні та неімунні реакції.

UDC 612.017:547.367:577.115.4

L. V. Yurlova, N. V. Kostyushova, I. I. Bokal, V. O. Ratushnenko

THIOLDISULFIDE SYSTEM CONDITION UNDER PROTEIN-PROTEIN CO-OPERATIONS IN IMMUNE AND NON-IMMUNE REACTIONS *IN VITRO*

Features and general conformities to the law of change of the protein and non-protein -SH- and -S-S-groups contents in the model immune and non-immune reactions *in vitro* with standard antigens and antibodies from diagnostic test-systems are studied in the work. Authors consider that along with the decision of antibodies by traditional immunological methods, it is expedient additionally to study contents of the protein and non-protein -SH- and -S-S-groups in the immune and non-immune reactions, that substantially extends analytical and diagnostic possibilities of modern immunological analysis

Key words: thioldisulfide system, -SH- and -S-S-groups, immune and non-immune reactions.

Передплачуйте і читайте журнал

ДОСЯГНЕННЯ БІОЛОГІЇ та МЕДИЦИНИ

У випусках журналу:

- Фундаментальні проблеми медицини та біології
- Нові медико-біологічні технології
- Оригінальні дослідження
- Огляди
- Інформація, хроніка, ювілеї

Передплатні індекси:

— для підприємств та організацій — 08204;

— для індивідуальних передплатників — 08205

Передплата приймається у будь-якому передплатному пункті