

УДК 611.08:577.11/.12

В.В. Іліка, О.М. Давиденко*, К.Г. Ташук, О.В. Гарвасюк**

*Кафедра патологічної анатомії (зав. – проф. І.С. Давиденко), *кафедра внутрішньої медицини та інфекційних хвороб (зав. – проф. О.І. Федів), **кафедра біоорганічної і біологічної хімії та клінічної біохімії (в.о.зав. – доц. Н.П. Григор'єва) Вищого державного навчального закладу України “Буковинський державний медичний університет”, м. Чернівці*

ОБГРУНТУВАННЯ МОЖЛИВОСТІ ЗАСТОСУВАННЯ МОРФОЛОГІЧНИХ МЕТОДІВ ДОСЛІДЖЕННЯ ДЛЯ ВИВЧЕННЯ ПРОЦЕСІВ ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСНЕННЯ БІОПОЛІМЕРІВ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

Резюме. На підставі проведеного аналізу встановлено, що нині морфологічними методами можна вивчати і кількісно оцінювати окремі аспекти вільнорадикальних процесів: відносну концентрацію нітропероксидів (метод хемілюмінесценції з люмінолом на заморожених гістологічних зрізах у поєднанні з комп'ютерною оцінкою інтенсивності світіння), окиснювальну модифікацію білків (гістохімічна реакція на “кислі” та “основні” білки з бромфеноловим синім за Mikel Salvo у поєднанні з мікроспектрофотометрією за коефіцієнтом R/B), окиснення сульфгідрильних груп (гістохімічна фері-феріціанідна реакція за Ліллі в поєднанні з комп'ютерною мікроденситометрією), протіоксидантні речовини - сумарний глутатіон, глутатіон-S-трансфераза, протеїн Bcl-2 (імуногістохімічний метод у поєднанні з комп'ютерною мікроденситометрією).

Ключові слова: вільнорадикальні процеси, морфологічні методи дослідження.

Метою проведеного огляду є узагальнення результатів досліджень щодо механізмів розвитку вільнорадикальних процесів у нормі й при патологічних станах з можливим застосуванням морфологічних методів дослідження, що є придатними для кількісних оцінок.

Загальновідомо, що більшість патологічних процесів перебігає на тлі утворення активних форм кисню, а також азоту та хлору - так званих “первинних” вільних радикалів (ВР), та інтенсифікації вільнорадикального окиснення біосубстратів, що належить до різних класів органічних сполук (білки, ліпіди, нуклеїнові кислоти). Цей процес зумовлений дисбалансом між прооксидантними й антиоксидантними системами, які блокують утворення високореактивних ВР [1] і є основою розвитку оксидантного стресу (окиснення компонентів клітини) [2].

Український вчений Ю.І. Губський [3] у своїх працях дав визначення оксидантного стресу (ОС) як біохімічного та патофізіологічного синдрому, що зумовлений надлишковим накопиченням у клітині хімічно активних вільнорадикальних форм кисню, а також азоту та інших вільних радикалів, як біомолекул, так і чужорідних хімічних сполук.

ОС виявляється при багатьох природньофізіологічних процесах (старіння, вагітність, фізичний і емоційний стрес), хворобах і патологічних синдромах, які останнім часом об'єднують в групу вільнорадикально зумовлених патологій [2, 4, 5].

На сьогодні встановлено, що вільнорадикальні процеси (ВРП) відіграють важливу роль у життєдіяльності клітин, і є необхідним етапом різних метаболічних процесів [6]. Вільнорадикальне окиснення сприяє

знищенню “неживих” клітин, елімінації ксенобіотиків, попереджає зляккі-сну трансформацію клітин, моделює енергетичні процеси за рахунок впливу на активність дихального ланцюга в мітохондріях, проліферацію і диференціацію клітин, транспорт іонів, бере участь у регуляції проникності клітинних мембран, у руйнуванні пошкоджених хромосом, у забезпеченні дії інсуліну. Участь ВР необхідною для синтезу простагландинів, простацикліну, тромбоксанів, лейкотрієнів, нуклеїнових кислот, вони приймають участь у регуляції ліпідного обміну та в метаболізмі катехоламінів [7].

Однак, їх роль у біологічних системах є динамічною. У даний час не викликає сумніву той факт, що вільнорадикальні реакції беруть участь в ініціації і становленні патофізіологічних процесів, що лежать в основі розвитку багатьох захворювань [4], а в ряді випадків - провідну роль у молекулярній патології організму [3].

Так, інтенсифікація ВРП є одним із провідних механізмів клітинної патології, включаючи серцево-судинні захворювання, різні зляккісні процеси, автоімунні хвороби, запальні процеси, нейродегенеративні захворювання та інші [8, 9].

Вірогідно, індукція і розвиток ракових захворювань пов'язані з хромосомними порушеннями та активацією онкогенів під дією активних форм кисню (АФК). Надлишкова продукція радикалів фагоцитами характерна для автоімунних захворювань, де радикали кисню можуть модифікувати антигени власного організму таким чином, що вони стають чужорідними і до них починають вироблятися антитіла. Гіпоксія мозку, що супроводжується реперфузією, призводить до значного посилення ВРП, ймовірно, внаслідок збільшення концентрації каталітично активного заліза за ураження клітин. Встановлено, що рівень ВР реакцій має важливу роль у процесах старіння [9]. Джерелами вільних радикалів у ділянці запалення є: дихальний вибух фагоцитів за їх стимуляції, каскад арахідонової кислоти, ферментні процеси в ендоплазматичному ретикулумі та пероксисомах, мітохондріях, цитоплазмі, а також самоокиснення катехоламінів, лейкофлавінів, гідрокінінів [10]. В умовах гострого запалення вільні радикали викликають руйнацію міжклітинного матриксу, чинять шкідливу дію на фібробласти, водночас вони можуть стимулювати процеси проліферації [11].

Накопичені в літературі дані про молекулярні механізми дії різних вільнорадикальних молекул свідчать про їхню участь у регуляції

росту та диференціювання клітин [12]. Відомо, що супероксидний радикал і перекис водню в низьких концентраціях стимулюють поділ клітин. Оксид азоту також бере участь у регуляції проліферації різних клітин, в тому числі і пухлинних [13].

Вільний радикал визначається як особливий вид молекули, здатної існувати незалежно і містить один або більше неспарених електронів, і саме ця неповна електронна оболонка надає йому високої реактивної здатності [1]. Реактивні окиснювачі відіграють важливу роль у процесах метаболізму клітин в умовах норми, а при утворенні в надлишкових концентраціях є факторами дезорганізації всіх структур клітин, що призводить до порушення функціональної активності і в кінцевому підсумку їх загибелі [14].

За своїм біохімічним походженням у клітині ВР умовно поділяють на: первинні (супероксид, нітрооксид, семіхінони); вторинні, які виникають внаслідок взаємодії первинних ВР з біомолекулами (гідроксил та радикали ліпідів та інших біомолекул) та третинні (радикали антиоксидантів) [3]. Основним джерелом вільних радикалів є кисень, до активних форм якого належать діоксид або супероксидний аніон-радикал, перекис водню, гідроксильний радикал [14].

Окрім продуктів відновлення кисню до активних форм його належать активовані кисневі метаболіти: молекули в синглетному стані та оксид азоту, пероксинітрит, гіпогалогеніти. Серед активних форм кисню найбільш стабільним є перекис водню, а найсильнішим окисником – гідроксильний радикал [15].

Кисень має як позитивні, так і потенційно небезпечні побічні ефекти для біологічних систем. Реактивні форми кисню мають важливу роль в якості вторинних месенджерів у багатьох внутрішньоклітинних сигнальних каскадів, спрямованих на підтримку гомеостазу клітини [16]. Реактивна здатність дозволяє кисню брати участь у передачі високоенергетичних електронів і підтримувати таким чином генерацію великої кількості аденозин-5-трифосфату через окисне фосфорилування.

Отже, наш організм перебуває під постійною окиснювальною атакою активних форм кисню, надлишкова продукція яких є фактором пошкодження – на протипагу в клітині існує природна антиоксидантна система. Вона представлена ферментами, серед яких важливе значення мають Mn^{2+} і Cu^{2+} - залежні супероксиддисмутази, глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза і каталаза. Супероксиддисмутаза конвертує супероксид-аніони на перекис водню,

який потім трансформується на воду іншими ферментами [1].

Складна система антиоксидантного захисту в цілому підтримує цей напад у стані балансу. А в тих випадках, коли цей баланс порушується, це може призвести до окиснювального стресу, який найкраще можна охарактеризувати, як зміни в прооксидантно-антиоксидантному балансі на користь перших, що відіграє важливу роль у патофізіології багатьох захворювань, в тому числі й ускладнень вагітності.

Концепція прооксидантно-антиоксидантного балансу є центральною для розуміння окисного стресу з кількох причин. По-перше, вона підкреслює, що до порушення можуть призвести зміни по обидві сторони від рівноваги (наприклад, аномально високий рівень активних форм кисню або недостатність системи антиоксидантного захисту). По-друге, вона висуває на перший план гомеостатичні концентрації АФК. Нарешті, концепція балансу звертає увагу на той факт, що на окиснювальний стрес відбудеться граційована відповідь. Отже, незначні порушення в балансі, швидше за все, призведуть до гомеостатичної адаптації у відповідь на зміни в найближчому оточенні, в той час як більші збурення можуть призвести до незворотнього пошкодження і загибелі клітин [16].

Як було зазначено вище, вільні радикали беруть участь у процесах проліферації та диференціюванні клітин, саме тому антиоксидантна система заслуговує на увагу. Так, антиоксидантні ферменти, контролюючи концентрацію радикалів, можуть слугувати в якості регуляторів проліферації. Підтвердженням даного припущення є результати проведених досліджень щодо клітинних і молекулярних механізмів регуляції проліферації пухлинних клітин, де наявний факт зворотньої кореляції між швидкістю росту пухлини і вмістом у ній Cu - супероксиддисмутази.

Таким чином, висока активність антиоксидантних ферментів є не тільки фактором стійкості пухлин до вільнорадикальних впливів, але й може гальмувати необмежений поділ клітин неоплазми.

Дані багатьох досліджень свідчать про те, що в силу своєї високої хімічної активності, активовані кисневі метаболіти можуть пошкоджувати внутрішньоклітинні структури й бути індукторами і медіаторами апоптозу. Фактори хімічної та фізичної природи, які за умов дії на клітини викликають окислювальний стрес, також індукують апоптоз [17].

Оксид азоту, що є регулятором внутрішнь-

оклітинних і міжклітинних процесів, бере безпосередню участь у реалізації апоптичної програми. Вважається, що оксид азоту може посилювати цитотоксичність вільних радикалів, причому NO-генеруючі сполуки, вступаючи в реакцію вільно-радикального окиснення, можуть утворювати ще більш токсичне з'єднання - пероксинітрит, який пошкоджує ДНК і викликає ковалентні модифікації білків у клітині, ініціюючи тим самим апоптоз [18]. Однак у багатьох дослідженнях NO розглядається швидше як антиоксидант, що гальмує розвиток радикальних окиснювальних реакцій. При цьому немає однозначної відповіді на питання, чи є NO інгібітором активації апоптозу [17].

Існує низка методів на виявлення радикалів. Безпосередній хімічний аналіз радикалів є проблематичним, оскільки на відміну від звичайних молекул, їх не можна ні виділити, ні очистити внаслідок величезної реактивної здатності. Зазвичай, визначають стійкі молекулярні продукти реакцій, в яких брали участь радикали.

Прямий метод аналізу радикалів – метод електронного парамагнітного резонансу (ЕПР). У принципі він дозволяє не тільки виявити, а й ідентифікувати багато радикалів шляхом аналізу надтонкою структурою сигналів ЕПР. Однак, у біологічних системах він часто виявляється недостатньо чутливим через вкрай низьку стаціонарну концентрацію радикалів у клітинах і тканинах. Наприклад, безпосередньо виявити радикали методом ЕПР, які утворюються за взаємодії іонів Fe²⁺ з гідропероксидами ліпідів, вдалося тільки в проточній системі з великою витратою реактивів або з використанням спінових пасток. Останні можуть впливати на біохімічні реакції, які відбуваються в системі або руйнуватися під час деяких з них.

Проте, метод хемілюмінесценції має значно більше переваг: по-перше, він зазвичай не пов'язаний зі зміною процесів у розчинах, клітинах або навіть цілих тканинах, де реєструється світіння, по-друге – є дуже чутливим за виявлення саме високореактивних радикалів. Найбільш відомими хемілюмінесцентними реакціями в біохімічних системах є: власне (надслабке) світіння при ланцюговому окисненні ліпідів, реакції люмінола з АФК (гідроксильним радикалом і супероксидом) і органічними радикалами, реакції люцигеніну і ряду похідних люциферинів з супероксидним радикалом [19].

Метод хемілюмінесценції часто застосовують при вивченні механізму фотобіологічних процесів з огляду на те, що на ранніх стадіях більшість із первинних продуктів

– це вільні радикали, а саме реакції вільних радикалів зазвичай супроводжуються сильною або слабкою хемілюмінесценцією [19, 20].

Вимірювання інтенсивності хемілюмінесценції – це інформативний метод для визначення ВР [21]. Для цієї мети частіше використовуються хемілюмінесцентні реакції за участю пероксиду водню з пероксидазою з коренів хрому та з залізом (II), але оскільки пероксид водню є нестабільним і розкладається на повітрі, найбільшого поширення набули методики, засновані на

хемілюмінесцентній реакції між люмінолом і 2,2 'азо-біс (2-амідінпропаном). До того інтенсивність хемілюмінесценції є показником кількості радикалів [22].

Прикладом хемілюмінесцентного методу є проведене нами дослідження з виявлення нітропероксидів в осередках запалення плаценти у вагітних із залізодефіцитною анемією. Методику здійснювали на заморожених зрізах плаценти. Хемілюмінесценцію ініціювали люмінолом і вивчали її у люмінесцентному мікроскопі ЛЮОММ-Р8. Кількісні вимірювання люмінесценції здійснювали на цифрових мікрофотографіях шляхом комп'ютерної оцінки інтенсивності світіння за шкалою у 256 градацій – від 0 (відсутність світіння) до “255” (максимальна інтенсивність світіння). Після проведеного дослідження у плацентах із запаленням у кілька разів зростала інтенсивність світіння (хемілюмінесценція) нітропероксидів, а поєднано із залізодефіцитною анемією показники в середньому були вищими ніж без анемії [23].

Продукція вільних радикалів, що призводить до окиснення ліпідів клітинних мембран, є одним із найбільш потужних стимулів, що ушкоджують клітини і тканини. АФК хімічно є дуже агресивними, крім ушкодження білків і ДНК, вони викликають перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ), що призводить до важкого пошкодження мембран. Один з найбільш ранніх ефектів ВРО мембранних ліпідів – електричний “пробій” ліпідного шару власним мембранним потенціалом. Він призводить до втрати мембраною її бар'єрних властивостей і, можливо, до подальшої активації процесів ВРО. Однак, крім головного субстрату окиснення молекул біомембран та ядерного хроматину, активні форми кисню викликають й окиснювальну модифікацію білків (ОМБ) [24].

Значна кількість науковців вважають, що однією з причин змін ОМБ може бути неконтрольована інтенсифікація ПОЛ. Відомо, що продукти ПОЛ, зокрема малоновий діальдегід, реагуючи з лізиновими залишками білків, спричиняють їх де-градацію з утворенням різноманітних цитотоксичних сполук. Інтенсифікація ОМБ може бути наслідком порушення функціонування захисних протирадикальних систем. У свою чергу, окиснювальній модифікації підлягають, насамперед, металоензими (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіонпероксидаза, цитохром Р-450). Будь-яка система, що утворює пероксид водню і відновлює тривалентне залізо до двовалентного або мідь двовалентну до міді одновалентної, може

викликати вибірккову модифікацію білків [15].

Інші вважають, що в стані оксидантного стресу атакуванню вільних радикалів в першу чергу підлягають не ліпіди, а білки плазматичних мембран [4]. Підтвердженням первинності перекисного окиснення білка (ПОБ) є наявність виражених змін за оксидантного стресу в ділянці анулярних ліпідів, що свідчать про провідну роль окиснювальної модифікації білків у деструкції клітинної мембрани [4, 25].

Вважається, що негативний ефект ОМБ у клітинах пов'язаний із тим, що окиснені білки є джерелом вільних радикалів, які виснажують запаси клітинних антиоксидантів. Продукти вільнорадикального окиснення білків призводять до окиснювального ураження ДНК. За цих ПОБ є найбільш раннім маркером окиснювального стресу [26, 27, 28].

Підвищення ОМБ є результатом порушення рівноваги між процесами, що регулюють синтез та оксидацию протеїнів, і зменшення активності протеаз, які селективно розщеплюють окиснювальні форми білків [15].

В якості основних індукторів ОМБ у першу чергу розглядаються активні форми кисню, збільшення вільного заліза, продукти перекисного окиснення ліпідів за зниження антиоксидантного захисту.

За дії АФК відбувається порушення нативної конформації білків з утворенням великих білкових агрегатів або фрагментація білкової молекули. Гідроксильний радикал найчастіше викликає агрегацію білків, а в комбінації з супероксиданіоном – фрагментацію з утворенням низькомолекулярних фрагментів. Радикали ліпідів можуть також викликати фрагментацію білкових молекул. Механізм формування агрегатів наступний: за дії оксидантів відбувається порушення нативної конформації ряду доменів білків. В результаті збільшується кількість гідрофобних залишків на поверхні глобул, що й зумовлює формування великих білкових конгломератів [29].

Динаміка змін продуктів ПОБ є відображенням ступеня окиснювального ураження клітин та резервно-адаптаційних можливостей організму. Вважається, що рівень показників ОМБ порівняно з рівнем ПОЛ є більш інформативним маркером наявності окиснювального стресу в організмі [26, 27, 28].

ОМБ в останній час перебуває у центрі уваги морфологів [30] та стала новим напрямком досліджень при різних патологічних станах [29].

Для мікроскопічної оцінки ОМБ в окремих клітинах можна застосовувати поєднання гістохімічної методики фарбування

бромфеноловим синім на «кислі» та «основні» білки з комп'ютерною мікроспектроскопією результатів забарвлення на кольорових цифрових копіях зоб'раження [30]. Так, на основі гістохімічного за-барвлення бромфеноловим синім при низькому рН «кислих» та «основних» білків за методом Mikel Calvo вченими розроблено спосіб визначення окиснювальної модифікації білків, який був адаптований для гістологічних парафінових зрізів плаценти, а потім для печінки, шматочки яких попередньо підлягали хімічній фіксації у нейтральному забуференому розчині формаліну. Спосіб був успішно апробований на пінеалоцитах шишкоподібної залози та епітеліальних клітинах ендометрію у різних станах непухлинного та пухлинного характеру. Досліджуючи різні структури плаценти за умов запального процесу, було відмічено характерні зміни окиснювальної модифікації білків трофобласта плаценти, які корелювали з концентрацією нітропероксидів цієї ж локалізації, що принципово підтвердило спроможність розробленої методики [31].

Дана методика включає в себе чотири етапи:

- 1) власне гістохімічний етап (фарбування бромфеноловим синім за Mikel Calvo);
- 2) оптичний етап (застосування мікроскопічної оптики);
- 3) фотографічний етап (застосування цифрового фотодокументування);
- 4) комп'ютерний мікроспектроскопічний етап (аналіз кольору на цифрових мікрофотографіях).

Зупинимось на останньому етапі даної методики. Для його проведення використовують систему комп'ютерного аналізу кольору RGB (від Red, Green, Blue) оскільки вона дає стандартні результати в різних комп'ютерних програмах (для прикладу - програми з вільною ліцензією: GIMP, Pixie, ColorPix, ImageJ.). Найбільш важливим моментом стандартизації процесу аналізу кольору є використання відносних показників, а не абсолютних, що дозволяє ефективно нівелювати всі можливі розбіжності у властивостях застосованої апаратури та устаткування. Зокрема, викори-стання системи аналізу кольору RGB передбачає можливість використання таких відносних показників як коефіцієнти R/B або G/B. Власне ці показники і є мірою окиснювальної модифікації білків при дослідженні гістохімічних препаратів, забарвлених бромфеноловим синім за Mikel Calvo [32]. На практиці більш вдалим виявилось використання коефіцієнту R/B.

Проте, незважаючи на всю привабливість і вже доведену ефективність вищевказаного методу, він має певні обмеження. Перше обмеження пов'язано з тим, що придатними для виконання гістохімічної

методики на “кислі” та “основні” білки з бромфеноловим синім за Mikel Calvo є тільки ті тканини, які зафіксовані в нейтральному фіксаторі. Інколи може бути придатний лужний фіксатор, але в жодному разі не кислий. У процесі зневоднення та заливки в гістологічні ущільнювачі також слід уникати окиснювальних агентів. По-друге, не можуть бути використані цифрові копії зображень гістохімічних зрізів, які отримані без забезпечення певних процедур стандартизації. Третє обмеження полягає в тому, що не можна виконувати вимірювання на об'єктах, які мають природний пігмент, наприклад, еритроцити, сидероцити, сидерофаги, гранули білірубину, кристали гематоїдину, гранули гематинів тощо. Природне забарвлення не дасть вірогідно зафіксувати зміни навіть у тому випадку, коли вони на перший погляд будуть явними. Останнім обмеженням є те, що вимірювання не можна проводити на гістохімічних препаратах, які заключені в кисле середовище (наприклад, канадський бальзам), оскільки кисле середовище обов'язково небажано змінить властивості барвника «бромфеноловий синій» [32].

У ракурсі ОМБ варто згадати також про гістохімічні методи визначення сульфгідрильних груп білків, які окиснюються за активізації процесів вільнорадикального окиснення. Зокрема, для кількісних гістохімічних досліджень сульфгідрильних груп білків може бути придатна фері-феріціанідна реакція за Ліллі [33]. З метою кількісної оцінки результатів фарбування за цієї реакції можна застосувати метод комп'ютерної мікроденситометрії на фотокопіях оптичних зображень.

Сучасні імуногістохімічні методи дозволяють оцінити стан окремих речовин з протіоксидантними властивостями. Зокрема, виробниками імуногістохімічних засобів розроблені антитіла, які дозволяють верифікувати глутатіон (сумарний глутатіон – відновлена і окиснена форми разом), глутатіон-S-трансфераза, протеїн Bcl-2 (більш відомий в якості протиапоптотичного фактора) [33, 34]. Всі вказані імуногістохімічні методики з метою їх кількісної оцінки можна поєднувати з комп'ютерною мікроденситометрією.

Висновок і перспективи подальших досліджень. Нині морфологічними методами можна вивчати і кількісно оцінювати окремі сторони вільнорадикальних процесів: відносну концентрацію нітропероксидів (метод хемілюмінесценції з люмінолом на заморожених гістологічних зрізах поєднано з комп'ютерною оцінкою інтенсивності світіння), окиснювальну модифікацію білків (гістохімічна реакція на “кислі” та “основні” білки з бромфеноловим

синім за Mikel Salvo поєднано з мікроспектрофотометрією за коефіцієнтом R/B), окиснення сульфгідрильних груп (гістохімічна фері-феріціанідна реакція за Ліллі поєднано з комп'ютерною мікроденситометрією),

протиоксидантні речовини – сумарний глутатіон, глутатіон-S-трансфераза, протеїн VcI-2 (імуногістохімічний метод поєднано з комп'ютерною мікроденситометрією).

Список використаної літератури

1. Состояние антиоксидантных систем при различных патологических состояниях организма / М.М. Бакуев, К.К. Магомедов, Р.К. Шахбанов, М.А. Магомедов // Известия Дагестанского гос. педагог. ун-та. Естественные и точные науки. – 2012. – № 3. – С. 62-67.
2. Маніщенкова Ю.О. Окислювальна модифікація білків у хворих з коморбідною патологією / Ю.О. Маніщенкова, О.А. Орлова, Л.В. Шкала // Укр. ж. екстремальної мед. імені Г.О. Можжаєва. – 2010. – Т. 11, № 1. – С. 119-122.
3. Губский Ю.И. Смерть клетки: свободные радикалы, некроз, апоптоз: монография / Ю.И. Губский. – Винница: Нова Книга, 2015. – 360 с.
4. Балоболкин М.И. Роль окислительного стресса в патогенезе сосудистых осложнений диабета (лекция) / М.И. Балоболкин, Е.М. Клебанова // Проблемы эндокринологии. – 2000. – Т. 46, № 6. – С. 29-34.
5. Свободнорадикальное окисление и сердечно-сосудистая патология: коррекция антиоксидантами / А.П. Голиков, С.А. Бойцов, В.П. Михин, В.Ю. Полумисков // Лечащий врач. – 2003. – № 4. – С. 70-74.
6. Регуляторные свойства глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы из печени крыс в условиях интенсификации свободнорадикального окисления при токсическом гепатите / М.В. Левенкова [и др.] // Биомед. химия. – 2006. – Т. 52, № 3. – С. 278-286.
7. Фархутдинов Р.Р. Свободнорадикальное окисление: мифы и реальность / Р.Р. Фархутдинов // Мед. вестн. Башкортостана. – 2006. – Т. 1, № 1 – С. 146-152.
8. Роль процессов свободнорадикального окисления липидов в патогенезе инфекционных болезней / А.П. Шепелев [и др.] // Вопросы мед. химии. – 2000. – № 2. – С. 780-785.
9. Роль перекисного окисления липидов в этиологии и патогенезе атеросклероза / В.З. Ланкин [и др.] // Кардиолог. – 2000. – Т. 7. – С. 48-57.
10. Петрович Ю.А. Свободнорадикальное окисление и его роль в патогенезе воспаления, ишемии и стресса / Ю.А. Петрович, Д.В. Гуткин // Патолог. физиолог. и эксперимент. терапия. – 1986. – № 5. – С. 85-92.
11. Алиева Н.З. Постнеклассическое естественнонаучное образование: концептуальные и философские основания / Н.З. Алиева – М.: Акад. Естествознания, 2008. – 512 с.
12. Antiapoptotic activity of the glutathione peroxidase homologue encoded by HTV-1. / I. Cohen, L. Zhao, D. Metivier [et al.] // Apoptosis. – 2004. – V. 9. – P. 2004.
13. Archer S. Measurement of nitric oxide in biological models. / S. Archer // FASEB J. – 1993. – V. 7. – P. 349-360.
14. Чеснокова Н.П. Источники образования свободных радикалов и их значение в биологических системах в условиях нормы / Н.П. Чеснокова, Е.В. Понукалина, М.Н. Бизенкова // Современные наукоемкие технологии. – 2006. – № 6. – С. 28-34.
15. Леоненко Н.С. Стан перекисного окислення ліпідів та окислювальної модифікації білків в організмі щурів при дії метсульфурон-метилу в малих дозах / Н.С. Леоненко // Сучасні пробл. токсиколог. – 2005. – № 4. – С. 53-57.
16. Burton G.J. Oxidative stress / G.J. Burton, E. Jauniaux // Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol. – 2011. – V. 25(3). – P. 287-299.
17. Кондакова И.В. Регуляция пролиферации и апоптоза опухолевых клеток свободными радикалами: дис. ... д. мед. наук : 14.00.14, 14.00.16 / Ирина Викторовна Кондакова. – Науч.-исслед. ин-т онкологии Томского науч. центра СО РАМН. – Томск, 2005. – 237 с.
18. H2C>2 induces a transient multiphase cell cycle arrest in mouse fibroblasts through modulating cycling D and P21 expression. / K. Barnouin, M. Dubuisson, E. Child [et al.] // J. Biol. Chem. – 2002. – V. 277. – P. 13761-13770.
19. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция / Ю.А. Владимиров, Е.В. Проскурина // Успехи биолог. химии. – 2009. – Т. 49. – С. 341-388.
20. Владимиров Ю.А. Кинетическая хемилюминесценция как метод изучения реакций свободных радикалов / Ю.А. Владимиров, Е.В. Проскурина, Д.Ю. Измайлов // Биофизика. – 2011. – Т. 56, № 6. – С. 1081-1090.
21. Измайлов Д.Ю. Определение активности антиоксидантов методом измерения кинетики хемилюминесценции / Д.Ю. Измайлов, Е.М. Демин, Ю.А. Владимиров // Фотобиолог. та фотомед. – 2011. – Т. 7(2). – С. 70-76.
22. Алексеев А.В. Определение антиоксидантов методом активированной хемилюминесценции с использованием 2,2'-АЗО-Бис (2-Амидинопропана) / А.В. Алексеев, Е.В. Проскурина, Ю.А. Владимиров // Вестн. Московского ун-та: сер. 2. Химия. – 2012. – Т. 53, № 3. – С. 187-188.
23. Гліка В.В. Хемілюмінесцентні дослідження нітропероксидів в осередку запалення при хоріонамніоніті та базальному децидуїті у вагітних із залізодефіцитною анемією / В.В. Гліка, І.С. Давиденко // Перспективні напрямки розвитку сучасної перинатології: матер. наук.-практ. конф. з міжнародною участю до 100-річчя з Дня народження професора Т.В. Борими. – Чернівці: Медуніверситет, 2014. – С. 108-111.
24. Литвинець Л.Я. Окислювальний стрес та антиоксидантний захист у дітей із різним ступенем контролю за бронхіальною астмою / Л.Я. Литвинець // Здоров'я ребенка. – 2013. – № 8. – С.

- 71-74. 25. Церебропротекторные эффекты антиоксидантов при нейроиммуноэндокринных нарушениях, обусловленных токсическим действием кислородных радикалов / В.В. Дунаев, Ю.И. Губский, И.Ф. Беленичев [и др.] // *Совр. пробл. токсикол.* – 2004. – № 1. – С. 7-13. 26. Динамика показателей окислительного стресса у больных, переносящих обострение бронхиальной астмы на фоне ингаляционной терапии липосомальными препаратами / А.В. Лисица, С.К. Соодаева, И.А. Климанов, А.Г. Чучалин // *Пульмонолог.* – 2010. – № 1. – С. 74-79. 27. Карімов І.З. Окисна модифікація білків і перекисне окислення ліпідів у розвитку метаболічної інтоксикації при патології / І.З. Карімов // *Лабораторна діагностика.* – 2005. – № 1(31). – С. 7-13. 28. *Dietary antioxidants and magnesium in type 1 brittle asthma: a case control study* / J.C. Baker, W.S. Tunnicliffe, R.S. Duncanson, J.C. Ayres // *Thorax.* – 2006. – Vol. 281(22). – P. 115-118. 29. Окислительная модификация белков: проблемы и перспективы исследования / Л.Е. Муравлева, В.Б. Молотов-Лучанский, Д.А. Клюев [и др.] // *Фундаментальные исследования.* – 2010. – № 1. – С. 74-78. 30. Еришид Б.М. Окиснювальна модифікація білків у цитоплазмі епітеліальних клітин ендометрію при його різних станах непухлинного та пухлинного характеру / Бен Мессаоуд Еришид, І.С. Давиденко // *Клін. Анатом. та оператив. хірург.* – 2008. – № 1. – С. 25-29. 31. Окислювальна модифікація білків у цитоплазмі сегментоядерних лейкоцитів крові у хворих на гострий гепатит А та В (цитохімічні дані) / І.С. Давиденко, О.М. Давиденко, О.В. Мироник, К.І. Яковець // *Новини от науцннйа напредьк-2009: матер. за V международна научна практична конференция. Том 5.* – София: “Бял ГРАД-БГ” ООД. – С. 28-30. 32. Давиденко І.С. Про деякі обмеження в застосуванні гістохімічної методики вимірювання рівня окиснювальної модифікації білків / І.С. Давиденко // *Матер. 97-ї підсумкової наук. конф. професорсько-викладацького персоналу Вищого державного навчального закладу України “Буковинський державний медичний університет” (Чернівці, 15, 17, 22 лютого 2016 р.)* – Чернівці: Медуніверситет, 2016. – С. 12-13. 33. *Catalog “Products and Services”.* – Denmark: *produktionsvej 42, 2016.* – 280 с. 34. *Методика морфологічних досліджень: монографія* / М.М. Багрій, В.А. Діброва, О.Г. Попадинець, М.І. Гришук – Вінниця: Нова Книга, 2016. – 328 с.

ОБОСНОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПРОЦЕССОВ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ БИОПОЛИМЕРОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Резюме. На основании проведенного анализа установлено, что на сегодняшний день морфологическими методами можно изучать и количественно оценивать отдельные стороны свободнорадикальных процессов: относительную концентрацию нитропероксидов (метод хемилюминесценции с люминолом на замороженных гистологических срезах в сочетании с компьютерной оценкой интенсивности свечения), окислительной модификации белков (гистохимическая реакция на "кислые" и "основные" белки с бромфеноловым синим по Mikel Calvo в сочетании с микроспектрофотометрией по коэффициенту R / B), окисления сульфгидрильных групп (гистохимическая фериферицианидна реакция по Лилли в сочетании с компьютерной микроденситометрией), антиоксидантного вещества – суммарный глутатион, глутатион-S-трансфераза, протеин Bcl-2 (иммуногистохимический метод в сочетании с компьютерной микроденситометрией).

Ключевые слова: свободнорадикальные процессы, морфологические методы исследования.

GROUNDING OF POSSIBILITIES OF MORPHOLOGICAL INVESTIGATION METHODS APPLICATION IN TERMS OF PROCESS OF FREE RADICAL OXIDATION OF BIOPOLYMERS (LITERATURE REVIEW)

Abstract. The conducted research revealed the fact that particular parts of free radical processes can currently be investigated and qualitatively calculated by means of morphological methods: relative concentration of nitro peroxides (luminol chemiluminescence method for frozen histological sections combined with computer assessment of the intensity of luminescence) oxidative modification of proteins (histochemical reaction “acidic” and “basic” proteins with blue Bromo by Mikel Calvo combined with microspectrophotometry at a rate of R/B), oxidation of sulfhydryl groups (histochemical reaction by Lillie combined with computer microdensitometry) antioxidant substances – total glutathione, glutathione-S-transferase, protein Bcl-2 (immunohistochemical method combined with computer microdensitometry).

Key words: free radical processes, morphological methods of investigation.

State Higher Educational Establishment in Ukraine

“Bukovinian State Medical University” (Chernivtsi)

Надійшла 02.06.2016 р.
Рецензент – проф. Братенко М.К. (Чернівці)