

DOI: 10.31393/reports-vnmedical-2025-29(3)-07

УДК: 617.7-001.4-085-092.9:615.275:615.356

ЕФЕКТИВНІСТЬ АНТИОКСИДАНТНОЇ ДІЇ L-ЛІЗИНУ – (S)-2,6-ДІАМІНОГЕКСАНОВОЇ КИСЛОТИ 3-МЕТИЛ-1,2,4-ТРИАЗОЛІЛ-5-ТІОАЦЕТАТУ У КРОЛІВ ПРИ КОНТУЗІЙНІЙ ТРАВМІ ОКА

Шелест О. Є., Семененко С. І., Вознюк Л. А.

Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова (вул. Пирогова 56, м. Вінниця, Україна, 21018)

Відповідальний за листування:

e-mail: ss11031980@gmail.com

Статтю отримано 11 червня 2025 р.; прийнято до друку 21 липня 2025 р.

Анотація. Контузія ока створює умови для неконтрольованої генерації вільних радикалів, що призводить до запуску каскаду реакцій нітрозативного стресу, який посилює початкове пошкодження тканин. В умовах цих стресових станів відбувається порушення балансу між утворенням активних форм кисню (АФК) та активних форм азоту (АФА) та функціонуванням антиоксидантних систем організму. Мета роботи – методом імуноферментного аналізу дослідити вплив ангіоліну та референс-препарату (очних крапель «ОМК-1») на рівні відновленого, окисненого глутатіону та рівня NO як потенційного механізму їхньої антиоксидантної дії. Досліди виконані на 20 кроликах обох статей каліфорнійської породи масою 3,0–3,5 кг. Експериментальну контузію ока у кроликів викликали дією потоку вуглекислого газу під тиском із використанням газобалонного пневматичного пістолета. В уражене око одразу закрпували досліджувані очні краплі «Ангіолін» 1% по 0,2 мл 3 рази на добу, а також референс-препарат – очні краплі «ОМК-1» (цитиколін-2%) протягом 10 днів. На 10-ту добу з верхньої очної вени брали кров для імуноферментного аналізу (0,5 мл). Флюорометрично визначали глутатіон відновлений та окиснений. Дані представлені як середнє значення. Застосовували дисперсійний аналіз (ANOVA) у разі нормального розподілу або критерій Краскела-Волліса (Kruskal-Wallis) для розподілу, відмінного від нормального. Для усіх видів аналізу статистично значущими вважали відмінності при $p < 0,05$ (95%). Проведене дослідження виявило, що терапія очними краплями «Ангіолін» сприяла нормалізації функціонування глутатінової ланки тіол-дисульфідної системи, зокрема підвищувала рівень відновленого глутатіону на 68,6% ($p < 0,05$) та знижувала концентрацію окисненого глутатіону на 50,7% ($p < 0,05$). Спостерігалось зниження гіперпродукції NO (рівень стабільних метаболітів NO знижується на 40,1%; $p < 0,05$) проти аналогічних показників контрольної групи. За ступенем впливу на ці показники «Ангіолін» достовірно перевершував краплі «ОМК-1».

Ключові слова: контузійна травма ока, глутатіон, оксид азоту, пероксинітрит, антиоксидантна дія, ангіолін.

Вступ

Контузія очного яблука спричиняє нітрозативний стрес через активацію запальних процесів, що призводять до надмірного утворення оксиду азоту (NO) та супероксид-аніону ($O_2^{\cdot-}$), які взаємодіють з утворенням високореактивного пероксинітриту ($ONOO^{\cdot-}$). Після контузії ока відбувається пошкодження тканин та ініціація запальної реакції. Це призводить до активації імунних клітин, зокрема макрофагів, нейтрофілів та мікроглії, які мігрують до місця травми. Гіперпродукція оксиду азоту (NO): активовані запальні клітини експресують індукцибельну синтазу оксиду азоту (iNOS). Цей фермент виробляє велику кількість NO, що є важливим сигнальним медіатором, але його надмірна концентрація стає токсичною. Одночасно з NO, пошкоджені тканини та активовані клітини продукують супероксид-аніон через неконтрольоване функціонування НАДФН-оксидаз. Утворений пероксинітрит є потужним окислювачем та нітруючим агентом, що призводить до пошкодження ДНК [7].

Отже, контузія ока створює умови для неконтрольованої генерації вільних радикалів, що призводить до запуску каскаду реакцій нітрозативного стресу, який посилює початкове пошкодження тканин.

Порушення балансу прооксидантно-антиоксидантної системи є провідним патогенетичним механізмом розвитку багатьох захворювань. Серед різновидів оксидативного

стресу особливого значення в контексті ушкодження тканин набуває нітрозативний стрес, спричинений надмірною продукцією оксиду азоту (NO) та його реактивних форм. NO, що синтезується ендогенно, відіграє важливу роль у регуляції судинного тону, нейротрансмісії та імунних реакцій. Однак за певних умов, зокрема при запаленні та ішемії, його надлишкове утворення призводить до взаємодії з активними формами кисню (АФК), насамперед із супероксидним радикалом, утворюючи високоцитотоксичний пероксинітрит ($ONOO^{\cdot-}$) [9, 10].

В умовах активації нітрозативного стресу, характерного для ішемії, запалення та травматичних ушкоджень, спостерігаються істотні зміни у функціонуванні глутатінової системи. Зокрема інтенсивне утворення пероксинітриту призводить до виснаження запасів відновленого глутатіону (GSH) та накопичення його окисненої форми (GSSG), що відображає порушення редокс-балансу [5]. Це співвідношення GSH/GSSG є важливим біомаркером клітинного стресу. Зниження рівня GSH також порушує нормальну регуляцію S-нітрозилювання, процесу, під час якого NO ковалентно зв'язується з цистеїновими залишками білків, модулюючи їхню функцію [3].

Провідним компонентом антиоксидантного захисту клітини є глутатінова ланка тіол-дисульфідної системи, що містить відновлений глутатіон (GSH) та його окиснену

форму (GSSG), а також ферменти, які забезпечують їхній метаболізм. Глутатіон є потужним антиоксидантом, який нейтралізує АФК, зокрема гідроксильні та пероксильні радикали, а також бере участь у детоксикації ксенобіотиків. Його відновлена форма (GSH) є донором електронів для глутатіонпероксидази, що каталізує відновлення перекису водню. Водночас глутатіон відіграє вирішальну роль у підтриманні нормального редокс-статусу клітини, забезпечуючи рівновагу між процесами окиснення та відновлення [6, 8].

В умовах нітрозативного стресу спостерігаються значні зміни у функціонуванні глутатінової ланки. Високі концентрації NO, а особливо пероксинітриту, призводять до виснаження запасів відновленого глутатіону (GSH) через його використання в реакціях нейтралізації. Це спричиняє зростання рівня окисненої форми глутатіону (GSSG), що відображає порушення антиоксидантного балансу та ініціацію апоптозу. Таке зміщення рівноваги GSH/GSSG слугує чутливим біомаркером оксидативного та нітрозативного стресу [5]. Крім того, NO може взаємодіяти безпосередньо з тіоловими групами глутатіону, утворюючи S-нітрозоглутатіон (GSNO), що розглядається як депо NO та механізм його транспортування в організмі. Проте зниження рівня GSH, необхідного для утворення GSNO, порушує цей захисний механізм, посилюючи пошкоджувальну дію NO та його похідних. Отже, нітрозативний стрес глибоко впливає на глутатіонову ланку тіол-дисульфідної системи, що призводить до порушення клітинної сигналізації, пошкодження макромолекул та загибелі клітин.

У контексті різних патологічних станів, пов'язаних з активацією нітрозативного стресу, вивчення змін у глутатіновій ланці тіол-дисульфідної системи набуває особливого значення.

Мета роботи – дослідити вплив ангіоліну та референс-препарату (очних крапель «ОМК-1») на рівні відновленого, окисненого глутатіону та рівня NO як потенційного механізму їхньої антиоксидантної дії.

Матеріали та методи

Досліди виконані на 20 кроликах обох статей масою 3,0–3,5 кг, у кожній групі по 5 тварин, порода кролів Каліфорнійська, отриманих від фермерського господарства Запорізького району. Перед початком дослідження тварин рандомізовано розподілили на 4 групи по 5 кроликів у кожній. Під час роботи з лабораторними тваринами дотримувалися методичних рекомендацій «Державного експертного центру МОЗ України» та вимог біоетики відповідно до національних «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (2001), які відповідають положенням «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей».

Експериментальну контузію ока у кроликів, спричинену дією потоку вуглекислого газу під тиском, моделювали за власною методикою з використанням

газобалонного пневматичного пістолета марки «Байкал МР-654К» з масою скрапленого CO₂ – 12 г, під тиском (Crosman, США, № серії 456739) [11]. Одразу після нанесення контузійної травми в уражене око закрапували досліджуваний препарат – очні краплі «Ангіолін» 1 % (виготовлені екстемпорально на кафедрі фармацевтичної, органічної та біоорганічної хімії ЗДМФУ із субстанції, отриманої з Науково-технологічного комплексу «Інститут монокристалів» НАНУ) по 0,2 мл 3 рази на добу, а також референс-препарат – очні краплі «ОМК-1» (цитиколін-2%) (Омікрон Італія С.р.л., Віале Бруно Буоцці, 5, 00197, м. Рим, Італія). На 10-ту добу у кроликів із контузією травмою ока (КТО) через 1 годину після останньої інстиляції досліджуваних очних крапель під наркозом (пропофол, 40 мг/кг, «Fresenius Kabi», Австрія) з верхньої очної вени брали кров для імуноферментного аналізу (0,5 мл).

Рівні метаболітів NO (NOx) у сироватці крові вимірювали методом Грісса [2]. Сироватку (0,1 мл) депротеїнізували додаванням 100 мкл 0,092 М сульфату цинку та 100 мкл 1 М NaOH, перемішували і залишали на 30–40 хв. Потім центрифугували при 4000g 10 хв (за температури 5°C) на центрифугу Eppendorf™ 5430 G (Німеччина). Після цього 100 мкл отриманого супернатанту переносили в лунку мікропланшета і в кожну лунку планшета додавали 0,5 мМ хлориду ванадію (III) для відновлення нітрату до нітриту. Потім вносили по 50 мкм сульфаніламідів та 0,2 мкм N-1-(нафтил)етилендіаміну. Загальний об'єм інкубаційної суміші – 300 мкл. Наступним етапом було інкубування проб протягом 30 хв при 37°C. Оптичну щільність сканували при 540 нм.

Визначення глутатіону відновленого та окисненого проводили флюорометрично [2]. Принцип методу ґрунтується на взаємодії ортофталієвого ангідриду з відновленим глутатіоном, унаслідок чого утворюється флюоресцентний комплекс, що реєструється флюорометрично при Ex/Em = 340/420 нм. Для визначення окисненого глутатіону в пробірку, що містить 2,0 мл 0,5 М фосфатного буфера pH 12,0, додають 0,1 мл сироватки крові. Задля маскування відновленого глутатіону додають 0,04 мл 0,5 мМ 1-метил-4-вініл-піридину. Реакційну суміш інкубують 60 хв за кімнатної температури. Для відновлення окисненого глутатіону в пробу додають 0,1 мл відновлювальної суміші (глутатіонредуктаза 38 одиниць, 7 мг НАДФН розчиняють у 20 мл 0,5 М фосфатного буфера pH 7,4). Відновлення проводять протягом 2 хвилин за температури 37°C. Далі в пробу додають 0,5 мл о-ортофталєвого ангідриду і флюорометрують при Ex/Em = 340/420 нм. Біохімічні дослідження проводили на спектрофотометрі і спектрофлюориметрі Fluorescence-Spectrophotometer, Agilent (USA) [1].

Результати дослідження розраховували із застосуванням стандартного статистичного пакета ліцензійної програми STATISTICA® for Windows 6.0 (StatSoftInc., №AXXR712D833214FAN5), а також SPSS 16.0, Microsoft Office Excel 2003. Нормальність розподілу оцінювали за

критерієм Шапіро-Вілкі (Shapiro-Wilk). Дані представлені як середнє значення. Для порівняння незалежних змінних у більш ніж двох вибірках застосовували дисперсійний аналіз (ANOVA) у разі нормального розподілу або критерій Краскела-Волліса (Kruskal-Wallis) для розподілу, відмінного від нормального. Для всіх видів аналізу статистично значущими вважали відмінності при $p < 0,05$ (95%), результати дослідження подавали як $M \pm m$.

Робота є частиною НДР кафедри клінічної фармації та клінічної фармакології ВНМУ «Оптимізація фармакотерапії при патології внутрішніх органів шляхом оцінки користі та ризиків при застосуванні лікарських засобів», державний реєстраційний номер: 0125U000803.

Результати. Обговорення

Як видно з таблиці 1, через 10 діб після моделювання контузіної травми ока спостерігається виражене пригнічення глутатіонової ланки тіол-дисульфідної системи на тлі активації нітрозативного стресу. Проведені біохімічні дослідження крові кролів контрольної групи (КТГ без лікування) виявили значне зниження концентрації відновленого глутатіону на 44,7% і підвищення його окисненої форми на 133% ($p < 0,05$) відносно інтактної групи. Подібні порушення антиоксидантної системи крові тварин із КТО відбувалися на тлі активації нітрозативного стресу – підвищення рівня стабільних метаболітів NO на 40,17% ($p < 0,05$) відносно групи КТО + краплі «Ангіолін», а також виявленого раніше підвищення нітротирозину. У групі КТО + краплі «ОМК-1» (цитиколін) виявили зниження концентрації відновленого глутатіону на 12,1% і зниження його окисненої форми на 13,8% ($p < 0,05$) проти інтактної групи. У групі КТО + краплі «Ангіолін» відмітили підвищення концентрації відновленого глутатіону на 33,5% і зниження його окисненої форми на 43,9% ($p < 0,05$) проти групи КТО + краплі «ОМК-1» (цитиколін).

Оптимальне співвідношення між рівнями відновлених та окиснених форм глутатіону, встановлене під дією ангіоліну, свідчить про активну мобілізацію тіол-дисульфідної системи для нейтралізації продуктів нітрозативного стресу. Збільшення функціональності цієї системи під впливом ангіоліну сприяє підвищенню біодоступності оксиду азоту, а також зменшує цитотоксичність NO та його похідних, що проявилось як виражене зниження рівня нітротирозину та стабільних метаболітів NO. Крім того, ангіолін може бути переносником NO, утворюючи з ним стабільні S-нітрозильні комплекси [2, 4]. Отже, ангіолін запобігає перетворенню NO під дією активних форм кисню (АФК) на пероксинітрит.

NO є нестабільним, короткоживучим радикалом, і для його стабілізації та подальшого транспортування передбачені такі механізми, як утворення зі сірковмісними низькомолекулярними сполуками (глутатіон, цистеїн, метіонін) стійких S-нітрозольних комплексів. В умовах дефіциту відновленого глутатіону порушується транспорт NO, оскільки монооксид азоту піддається атаці таких

АФК (активних форм кисню), як супероксидрадикал та гідроксилрадикал, з перетворенням у цитотоксичний продукт – пероксинітрит та ініціацією нітрозативного стресу [9].

Зниження рівня GSH (відновленого глутатіону) нижче за нормальні значення може слугувати індикатором порушення клітинного редокс-статусу та зміни редокс-залежної регуляції генів. Наслідком цього порушення є істотна зміна механізму клітинної редокс-залежної сигналізації, що контролюється як неферментативно, так і ферментативно за участю глутатіонтрансферази та ізоформ глутаредоксину [8].

Відомо, що GSH є нейротрансмітером і нейромодулятором: у мікромолярних концентраціях є агоністом глутаматних рецепторів, у мілімолярних концентраціях модулює SH-групи NMDA-рецепторів. Окиснені форми глутатіону в концентраціях вище 200 мкМ знижують експресію генів ранньої відповіді, а в концентраціях 5 мМ і більше активують p53-залежний апоптоз і знижують рівень HSP (білків теплового шоку) [4].

GSH, конкурентно зв'язуючись з оксидом азоту, утворює комплекс у вигляді S-нітрозоглутатіону, який формує депо ендogenous NO (подальше вивільнення NO каталізується тіоредоксиновою системою) [10].

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Курсове призначення очних крапель «Ангіолін» призводить до нормалізації функціонування глутатіонової ланки тіол-дисульфідної системи: підвищення рівня відновленого глутатіону на 68,6% ($p < 0,05$); зниження концентрації окисненого глутатіону на 50,7% ($p < 0,05$) відносно контрольної групи.

2. Спостерігається зниження гіперпродукції NO (рівень стабільних метаболітів NO знижується на 40,1%, $p < 0,05$) у групі КТО + краплі «Ангіолін» проти аналогічних показників контрольної групи. За ступенем впливу на ці показники ангіолін достовірно перевершує краплі «ОМК-1».

Розуміння механізмів змін у глутатіоновій ланці тіол-дисульфідної системи відкриває нові можливості для розробки терапевтичних стратегій, спрямованих на відновлення редокс-балансу та захист клітин від пошкоджень, спричинених надмірним утворенням АФА.

Таблиця 1. Концентрація маркерів енергетичного обміну в крові верхньої очної вени кролів після контузіної травми ока (КТО) і 10-добової експериментальної терапії, ($n=20$).

Експериментальні групи	GSH, $\mu\text{mol/L}$	GSSG, $\mu\text{mol/L}$	NO Metabolites (NOx), $\mu\text{mol/L}$
Інтактні, $n=5$	$681,2 \pm 54,0$	$35,2 \pm 3,5$	$6,7 \pm 0,5$
КТО (контрольна), $n=5$	$376,2 \pm 18,5^1$	$82,2 \pm 7,3^1$	$11,7 \pm 1,1^1$
КТО + краплі «ОМК-1» (цитиколін), $n=5$	$421,4 \pm 22,7^{1*}$	$72,2 \pm 5,5^1$	$10,4 \pm 1,2^1$
КТО + краплі «Ангіолін», $n=5$	$634,5 \pm 32,5^{1*2}$	$40,5 \pm 3,2^{1*2}$	$7,0 \pm 0,4^{1*2}$

Примітки: * - $p < 0,05$ щодо контрольної групи; ¹ - $p < 0,05$ щодо інтактної групи; ² - $p < 0,05$ відносно групи «ОМК-1».

Список посилань – References

- [1] Belenichev, I. F., Aliyeva, O. G., Popazova, O. O., & Bukhtiyarova N. V. (2023). Involvement of heat shock proteins HSP70 in the mechanisms of endogenous neuroprotection: the prospect of using HSP70 modulators. *Front Cell Neurosci.*, (17), 1131683. doi: 10.3389/fncel.2023.1131683
- [2] Belenichev, I., & Popazova, O., Bukhtiyarova, N., Savchenko, D., Oksenysh, V., & Kamyshnyi, O. (2024). Modulating Nitric Oxide: Implications for Cytotoxicity and Cytoprotection. *Antioxidants (Basel)*, 13(5), 504. doi: 10.3390/antiox13050504
- [3] Belenichev, I., Bukhtiyarova, N., Ryzhenko, V., Makyeyeva, L., Morozova, O., Oksenysh, V., & Kamyshnyi, O. (2024). Methodological [Approaches to Experimental Evaluation of Neuroprotective Action of Potential Drugs]. *Int J Mol Sci.*, 25(19), 10475. doi: 10.3390/ijms251910475
- [4] Belenichev, I., Popazova, O., Yadlovskiy, O., Bukhtiyarova, N., Ryzhenko, V., Pavlov, S., ... & Kamyshnyi, O. (2025). Possibility of Using NO Modulators for Pharmacocorrection of Endothelial Dysfunction After Prenatal Hypoxia. *Pharmaceuticals (Basel)*, 18(1), 106. doi: 10.3390/ph18010106
- [5] Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., & Milzani A. (2006). Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem.*, 52(4), 601-623. doi: 10.1373/clinchem.2005.061408
- [6] Forman, H. J., Zhang, H., & Rinna, M. K. (2014). Glutathione: from antioxidant to key regulator of cellular functions. *Journal of Cell Biochemistry*, 115(7), 1184-1196. doi: 10.1016/j.jcb.2013.08.001
- [7] Konovalova, N. V., Guzun, O. V., & Kovtun, O. V. (2023). Вплив контузії на око людини [The effect of concussion on the human eye]. В: Філатовські читання-2023. Матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю (24-26 травня 2023). (с. 135-137) [In: *Filatov readings-2023. Materials of Scientific and practical conference with international participation.* (May 24-26, 2023). (pp. 135-137)]. Одеса, Україна – Odesa, Ukraine.
- [8] Lu, S. C. (2013). Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta*, 1830(5), 3139-3145. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.09.008
- [9] Мамон, М., & Gorbach, T. (2021). (2021). Пероксинітрит – як біохімічний чинник розвитку захворювань людини [Peroxy-nitrite as a biochemical factor in the development of human diseases]. В: *Наукова практика: сучасні та класичні методи дослідження. Матеріали I Міжнародної наук.-теор. конф.* (26.02.2021). (с. 103-104). [In: *Scientific practice: modern and classical research methods. Materials of I International Scientific and Practical Conference.* Boston, USA – Бостон, USA. <https://doi.org/10.36074/logos-26.02.2021.v3.34>
- [10] Pacher, P., Beckman, J. S., & Liaudet, L. (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.*, 87(1), 315-424. doi: 10.1152/physrev.00029.2006
- [11] Semenenko S. I., Khodakivskyi O. A., Semenenko A. I., Semenenko N. O., Stoliarchuk O. V. (2020). A Method for Modeling Traumatic Brain Injuries of Varying Severity in Rats Based on Neuron-Specific Enolase Activity. Applicant and patent holder Vinnytsia National Pirogov Memorial Medical University. – No. u202004394; filed 14.07.2020; published 10.11.2020, Bul. No. 21

EFFICACY OF THE ANTIOXIDANT EFFECT OF L-LYSINE – (S)-2,6-DIAMINOHEXANOIC ACID 3-METHYL-1,2,4-TRIAZOLYL-5-THIOACETATE IN RABBITS WITH CONTUSIONAL EYE INJURY

Shelest O. E., Semenenko S. I., Vozniuk L. A.

Annotation. *Ocular contusion creates conditions for the uncontrolled generation of free radicals, which in turn leads to a cascade of reactions associated with nitrosative stress. This process intensifies the initial tissue damage. Under these stressful conditions, the balance between the formation of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) and the functioning of the body's antioxidant systems is disrupted. The purpose of this study was to use an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to investigate the effect of Angiolin and the reference drug (OMC-1 eye drops) on the levels of reduced and oxidized glutathione and NO levels, as a potential mechanism of their antioxidant action. The experiments were conducted on 20 male and female California rabbits weighing 3.0–3.5 kg. Experimental ocular contusion was induced in the rabbits by a pressurized stream of carbon dioxide using a gas-powered pneumatic pistol. The affected eye was immediately treated with 0.2 ml of the investigational eye drops, Angiolin-1%, three times a day for 10 days. The reference drug, OMC-1 eye drops (citicoline-2%), was also administered in the same manner. On the 10th day, a blood sample (0.5 ml) was taken from the superior ophthalmic vein for ELISA. Reduced and oxidized glutathione levels were determined fluorometrically. The data are presented as the mean value. A one-way analysis of variance (ANOVA) was used for normally distributed data, while the Kruskal-Wallis test was applied for non-normal distributions. For all analyses, differences were considered statistically significant at $p < 0.05$ (95%). The study revealed that Angiolin eye drops therapy contributed to the normalization of the glutathione link of the thiol-disulfide system. It increased the level of reduced glutathione by 68.6% ($p < 0.05$) and decreased the concentration of oxidized glutathione by 50.7% ($p < 0.05$). A decrease in NO overproduction was also observed (the level of stable NO metabolites decreased by 40.1% ($p < 0.05$)) compared to the control group. In terms of the magnitude of its effect on these parameters, Angiolin was demonstrably superior to OMC-1 drops.*

Keywords: *contusional eye injury, glutathione, nitric oxide, peroxynitrite, antioxidant action, Angiolin.*