

УДК: 616 – 056. 3 – 092: 612. 017] – 036. 12 – 092.2

НІТРОЗОГЛУТАТІОН: ОСОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ ПРИ ЛІМФОЦИТАРНО-ЕНДОТЕЛІОЦИТАРНІЙ ВЗАЄМОДІЇ *IN VITRO* ЗА УМОВ ХРОНІЧНОЇ ІМУНОКОМПЛЕКСЕМІЇ

Садляк О.В.

*Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького
Кафедра патологічної фізіології*

Метою нашої роботи було дослідження особливостей синтезу нітрозоглутатіону в лімфоцитах і ендотеліоцитах білих щурів при експериментальній хронічній імунокомплексемії та з'ясування коригуючого впливу корвітину на ці процеси. Аналіз інкубаційної взаємодії лімфоцитів та клітин ендотелію тварин із ХІК показав різке зниження GSNO у всіх тест-об'єктах (більш виражене в лімфоцитах), що може бути розцінено як розвиток нітрозактивного стресу в досліджуваних клітинах і є свідченням пониження системи антиоксидантного захисту клітин за цих умов. Додавання в інкубаційне середовище корвітину — біофлавоноїду з вираженими антиоксидантними і протизапальними властивостями — призвело до нормалізації всіх досліджуваних показників.

Ключові слова: оксид азоту, нітрозоглутатіон, хронічна імунокомплексемія, лімфоцити, ендотеліоцити, корвітин.

Вступ

Останнім часом оксид азоту (NO) визнають одним із найбільш різносторонніх факторів, які проявляють свій регулюючий вплив на імунну систему, маючи дію як між, так і внутрішньоклітинної молекули, що запускає імунну відповідь. Алергічні та запальні процеси, обумовлені дією цитокінів, індукують підвищений NOS-залежний синтез оксиду азоту в цілому організмі з переважанням індукбельної NO-синтази [10, 13]. Надмірна експресія цієї ізоформи NO призводить також і до зміни концентрації одного із стабільних метаболітів оксиду азоту – нітрозоглутатіону (GSNO), викликаючи розбалансування і збій в імунитеті [6, 7, 14]. Оскільки його концентрація має пряму залежність від ступеня активності патологічного процесу, рівень GSNO у крові та клітинах може бути оцінкою розвитку захворювання і контролем ефективності проведених лікувальних заходів [11].

Мета роботи – з'ясування особливостей синтезу нітрозоглутатіону в лімфоцитах і ендотеліоцитах білих щурів за умов змодельованої хронічної імунокомплексемії (ХІК) та вивчення коригуючого впливу корвітину на ці процеси.

Матеріали і методи досліджень

Експериментальні дослідження проводилися на 40 статевозрілих щурах-самцях масою 200-250 г. Моделювання ХІК створювали за допомогою класичної моделі Cochrane C. і Kofler D. [15] з посиланням на праці Williams R. [19].

Розчин корвітину (виробництва ЗАТ НВЦ “Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод”, Україна) вводили внутрішньоочеревинно в дозі 40 мг/кг раз на добу впродовж 10 днів. Підбираючи дозу препарату, керувались даними літератури [8, 12, 16, 17].

Евтаназію тварин здійснювали шляхом декапітації (комісія з питань біоетики при ЛНМУ ім. Д. Галицького, протокол № 15 від 12.12.2005 р.). Розвиток ХІК оцінювали у сироватці крові за рівнем ЦІК, визначення яких проводили за допомогою методу [3, 9]. Оцінку загальної комплексної активності сироватки крові визначали за методом [1]. Для проведення експериментів *in vitro* були використані лімфоцити периферичної крові і ендотеліальні клітини черевного відділу аорти білих щурів. Лімфоцити виділяли з гепаринізованої цільної крові шляхом центрифугування в градієнті щільності фікол-

верографіну ($p = 1,077$). Клітини три рази відмивали середовищем RPMI-1640, що містило 5 % ембріональної телячої сироватки [5]. Виділення ендотеліальних клітин з аорти проводили за допомогою ферментативного диспергування [4].

Інкубацію ізольованих лімфоцитів та ендотеліальних клітин проводили у середовищі 199 з 20 % вмістом телячої ембріональної сироватки в 24 лункових пластикових планшетах ("Sigma", США). Для запобігання змішуванню лімфоцитів та ендотеліоцитів клітини розділяли напівпроникними мембранами з діаметром пор 3 мкм ("Sigma", США), виділені клітини вносились в лунку планшети у співвідношенні 1:1. Клітини інкубували в термостаті при 37 °C в атмосфері із 5 % CO₂ впродовж 1 год. Розчин корвітину, в дозі 1·10⁻⁴ г/л, в умовах *in vitro* вносили в лунку планшети. Дозу застосування корвітину визначали на підставі літературних даних [8, 20].

Визначення сумарної активності NOS проводили спектрофотометричним методом [2], а вміст нітрозоглутатіону визначали в білкових аліквотах проб, після гідролізу SN-груп нітратом ртуті [18].

Отримані результати обробляли за допомогою комп'ютерної програми Microsoft Excel.

Результати дослідження та їх обговорення

Внаслідок проведених досліджень встановлено, що ферментативна активність NO у лімфоцитах (табл. 1.) характеризується незначним підвищенням рівня нітрозоглутатіону в інкубації, проведеної без і в присутності ендотеліальних клітин. Сумарна активність NOS у лімфоцитах за умов їх інкубації з ендотеліоцитами має лише тенденцію до зростання. Дослідження інкубації лімфоцитів без ендотеліоцитів за умов ХІК виявило наступні особливості: дуже різке зменшення

Таблиця 1.

Показники сумарної активності (NOS) та рівня нітрозоглутатіону (GSNO) в лімфоцитах інтактних та модельних тварин, після їх інкубації без і в присутності ендотеліальних клітин (пмоль/мг білка; $M \pm m$; $n = 10$)

Умови досліджу	Умови інкубації			
	Інкубація без ендотеліоцитів		Інкубація в присутності ендотеліоцитів	
	NOS пмоль/мг білка	GSNO пмоль/мг білка	NOS пмоль/мг білка	GSNO пмоль/мг білка
Контроль	25,97 ± 3,03	159,64 ± 10,31	27,85 ± 1,48	159,15 ± 15,20
P_1	–	–	> 0,05	> 0,05
Модель ХІК	26,10 ± 1,23	11,16 ± 0,99	21,38 ± 1,67	22,67 ± 2,01
P_2	–	–	< 0,05	< 0,001
P_{1-2}	> 0,05	< 0,001	< 0,001	< 0,001

Примітка: P_1 – вірогідність різниці показників сумісної інкубації без ендотеліоцитів і в їх присутності у контролі;
 P_2 – вірогідність різниці показників сумісної інкубації без ендотеліоцитів і в їх присутності у моделі;
 P_{1-2} – вірогідність різниці показників сумісної інкубації без ендотеліоцитів і в їх присутності у контролі та моделі

Таблиця 2.

Показники сумарної активності (NOS) та рівня нітрозоглутатіону (GSNO) в ендотеліоцитах інтактних та модельних тварин, після їх інкубації без і в присутності лімфоцитів (пмоль/мг білка; $M \pm m$; $n = 10$)

Умови досліджу	Умови інкубації			
	Інкубація без лімфоцитів		Інкубація в присутності лімфоцитів	
	NOS пмоль/мг білка	GSNO пмоль/мг білка	NOS пмоль/мг білка	GSNO пмоль/мг білка
Контроль	14,06 ± 2,02	129,73 ± 10,14	29,76 ± 2,27	134,56 ± 11,02
P_1	–	–	< 0,001	> 0,05
Модель ХІК	10,72 ± 1,52	12,72 ± 1,02	23,22 ± 2,13	48,76 ± 4,28
P_2	–	–	< 0,001	< 0,001
P_{1-2}	> 0,05	< 0,001	> 0,05	< 0,001

Примітка: P_1 – вірогідність різниці показників сумісної інкубації без лімфоцитів і в їх присутності у контролі;
 P_2 – вірогідність різниці показників сумісної інкубації без лімфоцитів і в їх присутності у моделі;
 P_{1-2} – вірогідність різниці показників сумісної інкубації без лімфоцитів і в їх присутності у контролі та моделі

вмісту GSNO у всіх досліджуваних тест-об'єктах. Так, при інкубації лімфоцитів без присутності ендотеліальних клітин вміст GSNO знизився на 93 % до $159,64 \pm 10,31$ пмоль/мг білка ($P < 0,001$), інкубація в присутності ендотеліоцитів показала зниження на 85,5 % до $159,15 \pm 15,20$ пмоль/мг білка ($P < 0,001$). Показник сумарної активності NOS за цих умов залишився майже без змін.

Ферментативна активність оксиду азоту в ендотеліальних клітинах при інкубації без лімфоцитів і в їх присутності за умов норми (табл. 2.) є наступною: зростає майже у 2 рази рівень NOS ($P < 0,001$), паралельно із цим вміст GSNO зріс незначно ($P > 0,05$). Стосовно аналогічних досліджень за умов ХІК прослідковуються зміни у всіх тест-об'єктах. Так, активність сумарної NOS незначно знижується ($P < 0,05$) по відношенні до контролю. По відношенні до контрольованого рівня спостерігається пониження даних показників, особливо при інкубації без лімфоцитів ($P < 0,001$), а стосовно вмісту GSNO – різке інгібування. Нітрозоглутатіон при інкубації ендотеліоцитів в цих умовах знизився на 90 % до $129,73 \pm 10,14$ нмоль/мг білка ($P < 0,001$), а в умовах сумісної інкубації з лімфоцитами на 63,8 % до $134,56 \pm 11,02$ нмоль/мг білка ($P < 0,001$).

Особливості синтезу GSNO за умов норми при інкубації лімфоцитів з ендотеліоцитами без корвітину і в його присутності представлені у (рис. 1.). Як впливає із отриманих даних, при сумісній інкубації лімфоцитів з ендотеліоцитами зі сторони GSNO змін не виявлено.

На фоні застосування корвітину у лімфоцитах (рис. 1.) встановлено зниження вмісту нітрозоглутатіону на 19 % до $159,15 \pm 15,20$ ($P < 0,05$).

За умов ХІК (рис. 1.) вміст GSNO при сумісній інкубації лімфоцитів з ендотеліоцитами зазнає різкого інгібування у по-

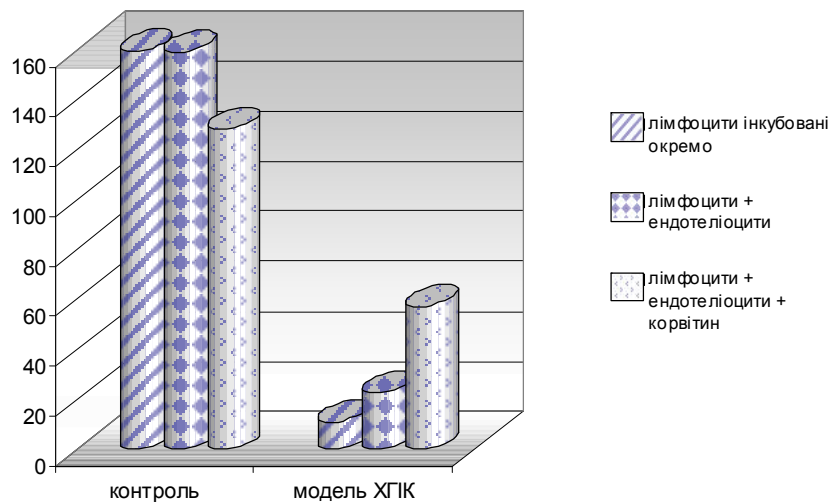


Рис. 1. Вплив корвітину на показники вмісту GSNO у лімфоцитах інтактних і дослідних тварин до і після їх інкубації з ендотеліоцитами

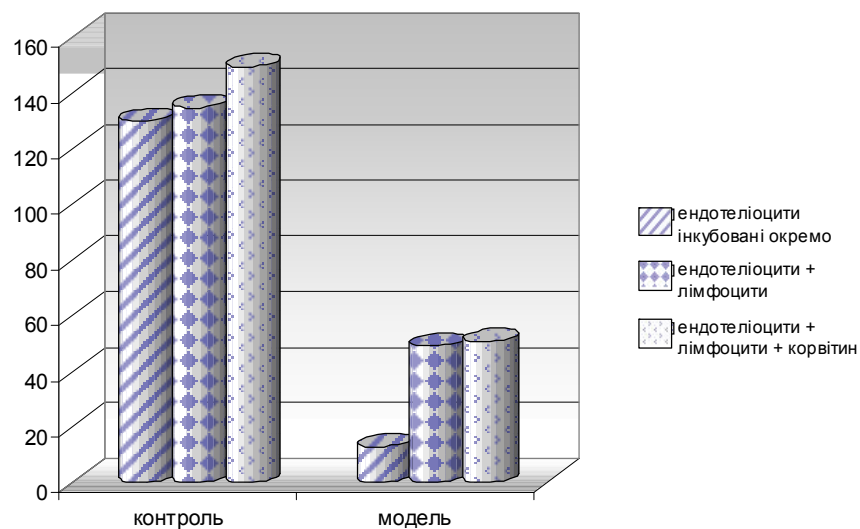


Рис. 2. Вплив корвітину на показники вмісту GSNO у ендотеліоцитах інтактних і дослідних тварин до і після їх інкубації з лімфоцитами.

рівнянні із аналогічними показниками контролю. Вихідний рівень нітрозоглутатіону у лімфоцитах понижений на 93 % до $159,64 \pm 10,31$ ($P < 0,05$). Сумісна інкубація лімфоцитів з ендотеліоцитами привела до пониження GSNO відносно контролю на 85,8 % до $159,15 \pm 15,20$ ($P < 0,05$).

Присутність корвітину в інкубаційному середовищі, хоч і підвищила вміст GSNO у 2,5 раза до $22,67 \pm 2,01$ ($P < 0,05$), але цей показник був нижчим за контрольний на 55,3 %.

У ендотеліоцитах інтактних тварин за умов їх інкубації з лімфоцитами (рис. 2.) спостерігаємо незначне підвищення вмісту нітрозоглутатіону. У ендотеліоцитах, інкубованих з лімфоцитами у присутності корвітину, прослідковується тенденція до підвищення вмісту GSNO.

Хронічна імунокомплексемія призвела до різкого падіння вмісту GSNO у ендотеліоцитах. Так, вихідний вміст цього ферменту падає на 90 % – до $129,73 \pm 10,14$ ($P < 0,05$). Сумісна інкубація ендотеліоцитів з лімфоцитами призвела до пониження GSNO відносно контролю на 63,8 % – до $134,56 \pm 11,02$ ($P < 0,05$). Застосування за цих умов корвітину призвело до незначного зростання GSNO, вміст якого на 66 % був нижчим у порівнянні з контролем ($P < 0,05$).

Висновки

1. Аналіз кооперації лімфоцитів та клітин ендотелію у тварин із хронічною імунокомплексемією показав різке зниження GSNO у всіх тест-об'єктах, що може бути розцінено як розвиток нітрозактивного стресу в досліджуваних клітинах і є свідченням пониження системи антиоксидантного захисту за цих умов.
2. Зменшення вмісту нітрозоглутатіону, більш виражене в лімфоцитах, можна пояснити тим, що лімфоцити є функціональніші та більше задіяні в реалізації імунної відповіді, тоді як ендотеліоцити, завдяки їх розміщенню на межі між кров'ю та іншими тканинами, є генетично більш стійкими,

оскільки першими зустрічаються з агресивними проявами патологічного процесу.

3. Корвітин в умовах *in vitro*, проявляючи інгібуючий вплив на розвиток нітрозактивного стресу як в лімфоцитах, так і в ендотеліоцитах, зумовлює відновлення порушеного балансу в метаболізмі оксиду азоту.

Література

1. Вільхова Т.К., Гаврилюк А.М., Кульчицька А.С. Переваги методу кількісного визначення рівня циркулюючих імунних комплексів //X Конгрес СФУЛТ: Тези доповідей. Чернівці-Київ-Чікаго.- 2004. – С. 386.
2. Викторов И.В. Роль оксида азота и других свободных радикалов в ишемической патологии мозга // Вестн. Рос. АМН. – 2000. — №4. – С. 5-10.
3. Гаєвська М.Ю. Циркулюючі імунні комплекси за умов норми та патології // Вісник наук. досл. – 2002. — №4. – С.37-40.
4. Ендотеліальні клітини за умов культивування (порівняльний аналіз методичних підходів) /Т.Н. Коваленко, О.І. Осадченко. І.Р. Ніконенко, Т.Г. Скібо / /Фізіол. журнал. – 1999.- Т.45, №4.- С. 120-124.
5. Иммуный статус, принципы его оценки и коррекция иммунных нарушений. / Передерий В.Г., Земсков А.М., Бычкова Н.Г., Земсков В.М. – К.: Здоров'я.- 1995.-211 с.
6. Л.Ф. Коноплева. Эндотелиальная дисфункция в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний и методы ее коррекции. //Therapia № 3 (56) 2011. С. 26-31.
7. М.А. Макаров, С.Н. Авдеев, А.Г. Чучалин. Роль дисфункции эндотелия и регидности артерий в патогенезе хронической обструктивной болезни легких // Терапевтический архив, 2012, № 3, С. 74-80.
8. Мойбенко А.А., Пархоменко А.И., Кожухов С.Н. Эффективность водорастворимой формы кверцетина

- (корвитина) при лечении острого коронарного синдрома с элевацией сегмента ST // Журнал АМН України. – 2003. – Т.9, №2. – С. 361-370.
9. Осипов С.Г., Еремеев В.В., Руднев В.И. Методы определения иммунных комплексов // Лаб. дело. – 1983. — №11. – С. 3-7.
 10. Сепиашвили Р.И. Функциональная система иммунного гомеостаза // Аллергология и иммунология – 2003. – Т.4, №2. – С. 5-14.
 11. Титов В.Ю., Иванова А.В., Агапов М.А. Содержание нитрита и N-нитрозосоединений плазмы как диагностический тест неспецифического воспаления. // Клиническая лабораторная диагностика № 1, 2011 С. 13-19.
 12. Флавоноїд кверцетин: фармакологічні властивості та клінічне застосування / Ватутін М.Т., Гончаренко Т.С., Склянка О.В., Вакхама С. // Ліки. – 2005. — № 3-4. – С. 19 – 27.
 13. Ярилин А.А. Межклеточная кооперация при иммунном ответе. Выбор клеткой ответа // Иммунология. - 1999.-№1.- С. 17-24.
 14. Ярилин А.А. Гомеостатические процессы в иммунной системе. Контроль численности лимфоцитов. // Иммунология. – 2004. — Т. 25, № 5.- С. 312 -319.
 15. Cochrane C.G., Koffer D. Immune complex in experimental animal and man. //Advanc.Immunol.- 1973.- Vol.16.-P.185-204.
 16. Cytoprotective effect of green tea extract and quercetin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress / Jeong Y.M., Choi Y.G., Kim D.S., Park S.H. et al. // Arch. Pharm. Res.-2005.- Vol.28(II).-P.1251-1256.
 17. Effekt of three flavonoids isolated from Japanose Polygonum species on superoxide generation in human neutrophils / Lur G., Wang W., Masuoka N., Asobe T., Yanashita K. et al. // Planta Med. – 2005.Vol.71(10). – P.933-937.
 18. Gerdel D. Gederbaum A.J. Ingibition of the catalytic activity of alcogoldegydrogenase by NO is associated with S – nitrosylation and the release of zinc //Biochemistry. – 1996. – 35, № 50/ – P. 16186 – 16194.
 19. Williams R.C. Immune complex in clinical and experimethal medicine // Cambridge: Harvard Univer. Press.- 1980.– 520 p.
 20. Yuan Z., Chen L., Fan L. et al. Liposomal quercetin efficiently suppresses growth of solid tumors in murine models // Clin/ Cancer Res/ – 2006. – 12. – P. 3193-3199.

Резюме

НИТРОЗОГЛУТАТИОН: ОСОБЕННОСТИ СИНТЕЗА ПРИ ЛИМФОЦИТАРНО-ЭНДОТЕЛИОЦИТАРНОМ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ *IN VITRO* ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИММУНОКОМПЛЕКСЕМИИ

Садляк А.В.

Целью нашей работы было исследование особенностей синтеза нитрозоглутатиона в лимфоцитах и эндотелиоцитах белых крыс при экспериментальной хронической иммунокомплексемии и выяснение корректирующего воздействия корвитина на эти процессы. Анализ инкубационного взаимодействия лимфоцитов и клеток эндотелия животных с ХИК показал резкое снижение GSNO во всех тест-объектах (более выраженное в лимфоцитах), что может быть расценено как развитие нитрозактивного стресса в исследуемых клетках и является свидетельством угнетения системы антиоксидантной защиты клеток при этих условиях. Добавление в инкубационную среду корвитина — биофлавоноидов с выраженными антиоксидантными и противовоспалительными свойствами — привело к нормализации всех исследуемых показателей.

Ключевые слова: оксид азота, нитрозоглутатион, хроническая иммунокомплексемия, лимфоциты, эндотелиоциты, корвитин.

Summary

NITROZOGLUTATIONI: SPECIFIC SYNTHESIS IN LYMPHOCYTO-ENDOTELIOTCYTIC INTERACTION *IN VITRO* UNDER CONDITIONS OF CHRONIC IMMUNOCOMPLEXEMIA

Sadlyak O.V.

The aim of our work was to study the characteristics synthesis of nitrozoglutationi in lymphocytes and endothelial rats with experimental chronic immunocomplexemia and determine corrections influence of corvitini on these processes. Analysis of incubation interaction of lymphocytes and endothelial cells of animals with CIU showed a sharp decrease in GSNO in all test sites

(more pronounced in lymphocytes), which can be regarded as a development nitrosoactivity stress in the studied cells and is a testament to decrease antioxidant system of cells under these conditions. Adding to the incubation medium corvitini — bioflavonoid with pronounced antioxidant and anti-inflammatory properties, led to normalization of all studied parameters.

Key words: *nitrix oxide, nitrozoglutation, chronic immunocomplexemia, lymphocyte, endoteliocyte, Corvitini.*

*Впервые поступила в редакцию 19.09.2013 г.
Рекомендована к печати на заседании редакционной коллегии после рецензирования*

УДК 613.32-099:546.56-06:612.015.11]-092.9

ПЕРЕКИСНЕ ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ ТА АНТИОКСИДАНТНИЙ ЗАХИСТ В ОРГАНІЗМІ ПІДДОСЛІДНИХ ТВАРИН ПІД ВПЛИВОМ СУБТОКСИЧНИХ ДОЗ МІДДІ НА ФОНІ ВЖИВАННЯ ПИТНОЇ ВОДИ З РІЗНИМ ВМІСТОМ СТЕАРАТУ КАЛІЮ

Лотоцька О.В.

ДВНЗ “Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України”, м. Тернопіль, llototska@yandex.ru

Метою дослідження було встановити особливості перекисного окислення ліпідів та стан аксидантного захисту в гомогенаті печінки білих щурів під впливом субтоксичних доз мідді на фоні вживання питної води з різним вмістом стеарату калію. Встановлено, що тривале вживання піддослідними тваринами питної води з концентраціями стеарату калію 125,0 і 62,5 мг/дм³ негативно впливає на стан клітинних мембран гепатоцитів внаслідок активації процесів перекисного окиснення ліпідів. Недостатня активність антиоксидантної системи сприяє посиленню вираженості ендогенної інтоксикації. Комбінація стеарату калію з міддю навіть після одноразового введення останньої посилює токсичну дію ПАР, про що свідчило більш виражена активація процесів перекисного окиснення ліпідів та пригнічення активності антиоксидантної системи.

Ключові слова: *перекисне окислення ліпідів, антиоксидантний захист, мідь, стеарат калію, субтоксична доза.*

Вступ

Питне водопостачання країни майже на 80 відсотків забезпечується за рахунок поверхневих вод, тому якість води у поверхневих водних об'єктах є вирішальним чинником санітарного та епідемічного благополуччя населення [1].

Практично всі поверхневі джерела водопостачання України впродовж останніх десятиліть інтенсивно забруднювались. Зараз особливу небезпеку представляють органічні рештки, поверхнево-активні речовини (ПАР) і важкі метали (ВМ). У водні об'єкти ці речовини надходять з промислово-побутовими та промислови-