

РОЛЬ АКТИВНИХ ФОРМ КИСНЮ У РОЗВИТКУ ГЕПАТОПУЛЬМОНАЛЬНОГО СИНДРОМУ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

©І. Я. Криницька

ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського»

РЕЗЮМЕ. Досліджено вплив двох експериментальних моделей гепатопульмонального синдрому на генерацію активних форм кисню моноцитами цільної крові і альвеолярними макрофагами бронхоальвеолярного змиву. Встановлено, що у щурів обох експериментальних груп спостерігається достовірне збільшення генерації активних форм кисню.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: гепатопульмональний синдром, активні форми кисню, моноцити, альвеолярні макрофаги.

Вступ. Утворення активних форм кисню в результаті процесів життєдіяльності організму є невід'ємною складовою аеробного метаболізму. Утворення активних форм кисню, які можуть бути вільнорадикальними частинками (супероксид-аніон, пероксидний, гідроксильний радикали) або нейтральними молекулами (пероксид водню, синглетний кисень) в біологічних системах відбувається постійно і є як прямим результатом функціонування ряду специфічних ферментативних систем, так і наслідком побічного процесу безлічі окиснювально-відновних реакцій в клітині [1, 2, 3, 4]. Кожна клітина людського організму за нормальних фізіологічних умов продукує 1010 молекул (0,15 моля) супероксиду на добу, або 1,75 кг у рік [5, 6].

З точки зору патологічної фізіології найбільш несприятливими факторами є взаємодія АФК з амінокислотними залишками в молекулах протеїнів, денатурація функціонально циркулюючих і структурованих в тканинах білків, а також денатурація ДНК. Ідентифіковано близько 100 варіантів ушкодження ДНК вільними радикалами та модифікацій пентоз і азотистих основ [5].

Головними продуцентами АФК в організмі є активовані фагоцити (моноцити і гранулоцити крові, макрофаги), які виділяють супероксид в реакції, що каталізується ферментним комплексом – НАДФ-оксидазою. Після розпізнавання, прикріплення і, особливо, захоплення об'єкта фагоцити захоплюють позаклітинний кисень і потім генерують супероксид-аніон, перекис водню (H_2O_2), гідроксилу радикал ($OH\cdot$), гіпохлорну ($HOCl$) і гіпобромну кислоти ($HOBr$), що і складає суть «респіраторного вибуху» [7].

Відомо, що 95–98 % кисню у клітинах використовується при окисному фосфорилуванні мітохондріальною цитохромоксидазою, яка каталізує 4-х електронне відновлення кисню до води ($O_2 + 4H^+ + 4e^- > 2H_2O$). При цьому відбувається 4 етапи одноелектронного відновлення, внаслідок цього виникають проміжні продукти радикальної природи. У ланцюгу переносу електронів можливе не-

повне відновлення кисню: у випадку приєднання одного електрона утворюється супероксидний радикал, а двох – пероксид водню. Дихальний ланцюг мітохондрій є головним внутрішньоклітинним джерелом генерації АФК, надмірне утворення яких призводить до порушення метаболічних процесів, структурних компонентів клітин, зокрема самих мітохондрій та їх геному, а саме зміни проникності їх мембран, формування специфічного комплексу мітохондріальних пор та ініціювання мітоптозу [8, 9].

Метою дослідження було визначити рівень продукції АФК моноцитами крові та альвеолярними макрофагами бронхоальвеолярного змиву у щурів за умови експериментального гепатопульмонального синдрому.

Матеріал та методи досліджень. Досліди проводили на 56 безпородних щурах-самцях масою 180–220 г. Перша експериментальна модель ГПС була створена шляхом накладання подвійної лігатури на загальну жовчовивідну протоку і подальшого його пересічення скальпелем [10]. В контрольній групі № 1 тварин загальна жовчовивідна протока була відділена від тканин, але не пересікалася. Післяопераційна рана пошарово наглухо зашивалася. На 31 добу після операції тварин виводили з експерименту під тіопенталовим наркозом. Друга експериментальна модель ГПС була створена шляхом 8-тижневого внутрішньошлункового введення олійного розчину CCl_4 (400 г на 1 л) в дозі 0,5 мл на 100 г маси тіла тварини в перший день експерименту, 0,3 мл на 100 г на третій день експерименту і далі кожного третього дня до закінчення експерименту 0,3 мл на 100 г. Додатково в раціон щурів було введено суміш кукурудзяної муки, смальцю і холестеролу та розчин алкоголю. Контрольна група тварин №2 перебувала на стандартному раціоні віварію і отримувала внутрішньошлунково оливкову олію в еквівалентній кількості [11].

Утримання тварин та експерименти проводили у відповідності до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які викорис-

товуються для експериментальних та інших наукових цілей» [12]. Після забою тваринам розкривали грудну клітку і відділяли легенево-серцевий комплекс. Для дослідження використовували гепаринізовану цільну кров та бронхоальвеолярний змив (БАЗ). З легень отримували БАЗ за стандартною методикою [13].

Популяцію моноцитів крові отримували за допомогою центрифугування на подвійному градієнті щільності 1,077 і 1,093 фіколу-верографіну. Після 40 хв центрифугування при температурі 4 °С і швидкості 1500 об/хв утворювалися дві інтерфази. Верхня інтерфаза (на межі плазма-верифікол щільністю 1,077) складалася із моноклеарних клітин – 80 % лімфоцитів, 15–18 % моноцитів і незначного (2–3 %) додатка гранулоцитів. Розділення лімфоцитів і моноцитів здійснювали методом ізокінетичного центрифугування протягом 5 хв при 400 об/хв в градієнті фіколу-верографіну щільністю 1,060 [7]. Популяцію альвеолярних макрофагів отримували шляхом центрифугування клітинної суспензії БАЗ (2×10^6 клітин/мл) при 1500 об/хв протягом 20 хвилин при кімнатній температурі. Верхня інтерфаза (на межі БАЗ-верифікол щільністю 1,048) складалася із альвеолярних макрофагів [14].

Рівень активних форм кисню визначали за допомогою барвника із заблокованою флуоресценцією – дигідродихлорфлуоресцеїну діацетату (ДФХ-ДА) [15]. До 90 мкл клітинної суспензії ($2 \cdot 10^6$ клітин в 1 мл) додавали 10 мкл робочого розчину ДФХ-ДА (Sigma, США), інкубували 20 хв при температурі 37. В пробу вносили 11 мкл 0,2 % розчину ЕДТА та інкубували 30 хв при температурі 37 °С, потім центрифугували 1 хв при 1 500 об. і видаляли супернатант. Реакцію зупиняли 200 мкл лізуючого розчину (0,826 г NH_4Cl , 0,1 г NaHCO_3 , 3,7 мг ЕДТА-Na на 100 мл дистильованої води), після чого клітини однократно відмивали і ресуспендували в 400 мкл фосфатно-сольового буфера (pH =7,4). Аналіз зразків клітин проводили на проточному цитометрі Epics XL ("Beckman Coulter", США) з допомогою гістограм та відповідних їм вікон статистики, що містили показники середньої геометричної інтенсивності світіння мічених клітин. Значення досліджуваного параметра виражали у відсотках.

Статистичну обробку отриманих даних проведено стандартними методами варіаційної статистики з використанням пакета статистичних програм. Результати наведено як ($M \pm m$), де M – середнє значення показника, m – стандартна похибка. Достовірність розбіжностей між досліджуваними показниками визначалася за допомогою двобірного критерію Стюдента.

Кореляційний аналіз проводили між досліджуваними показниками. Вираховували коефіцієнт лінійної кореляції (r) та його достовірність (p), що відповідним чином позначалося у таблицях (кор-

еляційних матрицях). Якщо показник $r=0$, зв'язок вважався відсутнім, у діапазоні 0–0,3 – свідчив про слабку кореляцію, проміжок показника 0,3–0,7 характеризував зв'язок середньої сили, а інтервал 0,7–1,0 вказував на значну кореляційну взаємодію. Коефіцієнт кореляції оцінювали як достовірний при $p < 0,05$.

Результати й обговорення. Встановлено, що у щурів першої експериментальної групи (на 31-у добу після перев'язки загальної жовчовивідної протоки) генерація АФК моноцитами гепаринізованої цільної крові достовірно зростала в 1,6 рази ($p < 0,001$), порівняно з контрольною групою №1 (табл. 1). У щурів другої експериментальної групи (тетрахлорметан-індукований цироз) генерація АФК моноцитами цільної крові також достовірно зростала – в 1,7 рази ($p_1 < 0,001$).

Привертає увагу досить високе значення АФК в контрольних групах тварин. Проте АФК мають не лише цитотоксичну дію, але й можуть виступати в якості вторинних месенджерів при підтримці фізико-хімічних властивостей біологічних мембран, а також у регуляції таких клітинних реакцій як проліферація, диференціювання й апоптоз [16].

Генерація АФК фагоцитами запускається в результаті активації НАДФН-оксидази. До НАДФН-оксидазного комплексу входять зв'язаний з цитоплазматичною мембраною цитохром $p558$, який складається з двох білкових субодиниць $p91^{\text{PHOX}}$, $p22^{\text{PHOX}}$, і три цитоплазматичні білки $p40^{\text{PHOX}}$, $p47^{\text{PHOX}}$, $p67^{\text{PHOX}}$, зв'язування яких з мембраною необхідне для активації ферменту. Активація НАДФН-оксидази відбувається прозапальними цитокінами (IFN- γ , TNF- α , TGF- β , IL-1, 7) і деякими ростовими факторами, під впливом яких відбувається міграція цитозольного комплексу до мембран та зв'язування його з цитохромом $p558$. Разом з НАДФН-оксидазою у процесах утворення АФК в моноцитах бере участь мієлопероксидаза, яка при активації клітин декретується з гранул в позаклітинне середовище. Активована НАДФН-оксидаза відновлює молекулярний кисень до супероксид-аніон радикала, що супроводжується окисненням НАДФН. Регенерація НАДФН відбувається за рахунок паралельної активації ферментів пентозофосфатного шляху, які утилізують глюкозу [5, 18, 19].

Відомо, що в генерації АФК клітинами важливу роль відіграє надходження позаклітинного кальцію в цитозоль клітини. Так, індукований іонофорами вхід Ca^{2+} в клітину супроводжується активацією протеїнкінази C і кальмодулінзалежних кіназ. Це спричиняє фосфорилування цитозольних компонентів НАДФН-оксидази, що ініціює її активацію [5, 20].

В активацію кисню моноцитами окрім НАДФН-оксидази і мієлопероксидази можуть вносити свою лепту ферменти метаболізму арахідонової кислоти –

Таблиця 1. Рівень АФК у щурів з експериментальним гепатопульмональним синдромом ($M \pm m$)

Дослідна група	Контрольна група № 1 (n=12)	Експериментальна група № 1 (n=12)	Контрольна група № 2 (n=12)	Експериментальна група № 2 (n=12)
Клітинна суспензія моноцитів				
Внутрішньоклітинний рівень АФК, %	36,5 ± 5,4	59,4 ± 5,3 $p_1 < 0,001$	41,2 ± 3,0	72,0 ± 5,7 $p_1 < 0,001$
Клітинна суспензія альвеолярних макрофагів				
Внутрішньоклітинний рівень АФК, %	42,6 ± 4,2	91,8 ± 5,0 $p_1 < 0,001$	48,0 ± 3,1	96,0 ± 2,3 $p_1 < 0,001$

Примітки:

1. p_1 – різниця достовірна у порівнянні з контрольними тваринами;
2. p_2 – різниця достовірна у порівнянні з ураженими тваринами.

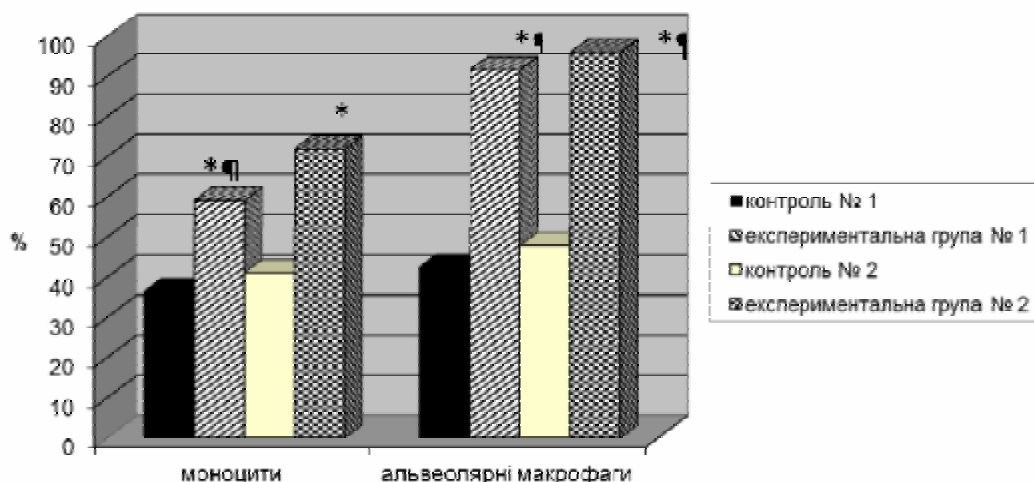


Рис. 1. Зіставлення генерації активних форм кисню у крові і бронхоальвеолярному змиві (* – різниця достовірна у порівнянні з контрольними тваринами ($p < 0,001$)).

циклооксигенази I і II типів та 5-ліпоксигеназа. Утворення вільної арахідонової кислоти в моноцитах відбувається в результаті реакції гідролізу фосфоліпідів цитозольної Ca^{2+} -залежної фосфоліпази A_2 . Арахідонова кислота може активувати НАДФН-оксидазу моноцитів, активуючи протонний канал, зв'язаний з НАДФН-оксидазою [5].

Паралельно з активацією фосфоліпази A_2 відбувається активація 5-ліпоксигенази. Ріст концентрації цитозольних іонів кальцію збільшує гідрофобність 5-ліпоксигенази, що сприяє зв'язуванню фермента з мембраною ядра і 5-ліпоксигеназ активуючим білком. В результаті активування 5-ліпоксигеназа синтезує лейкотрієни та АФК.

Важливим є зіставлення генерації АФК моноцитами крові та альвеолярними макрофагами БАЗ. Встановлено, що зміни продукції кисневих радикалів відбуваються однонаправлено у бік поглиблення окиснювального стресу. Так, продукція АФК альвеолярними макрофагами (табл. 1), у щурів з першої експериментальної групи також достовірно збільшувалася в 2,1 раза ($p_1 < 0,001$), а у щурів другої експериментальної групи – в 2 рази ($p_1 < 0,001$).

Проведений корелятивний аналіз показав, що при моделюванні гепатопульмонального синдрому шляхом перев'язки загальної жовчовивідної протоки рівень активних форм кисню моноцитів крові мав високий позитивний корелятивний зв'язок з рівнем АФК альвеолярних макрофагів БАЗ ($r=0,84$) ($p < 0,01$). При тетрахлорметан-індукованому цирозі (експериментальна модель № 2) рівень активних форм кисню моноцитів крові також мав позитивний корелятивний зв'язок середньої сили з рівнем АФК альвеолярних макрофагів БАЗ ($r=0,64$) ($p < 0,05$). Це свідчить про однаправленість змін окиснювального гомеостазу у крові та легенях при використаних моделях гепатопульмонального синдрому.

У фізіологічних умовах в легеневій тканині, АФК, що окрім альвеолярних макрофагів генеруються нейтрофілами та еозинофілами, є важливим елементом резистентності організму, оскільки мають антибактеріальні та протипухлинні властивості. При надходженні у альвеоли в надлишковій кількості АФК здатні індукувати системні процеси перекисного окиснення ліпідів біологічних мембран,

що сприяє їх дисфункції, деградації структурної цілісності і бар'єрних властивостей, а також зумовлюють порушення різних рецепторних, іонообмінних та метаболічних функцій клітини [21].

Висновки. 1. Отже, у щурів з експериментальним гепатопульмональним синдромом як у моноцитах крові, так і в альвеолярних макрофагах бронхоальвеолярного змиву достовірно зростає генерація активних форм кисню, що вказує на виражений дисбаланс вільнорадикального гомеостазу. 2. При зіставленні результатів продукції АФК моно-

цитами та альвеолярними макрофагами виявлено синхронний розвиток окиснювального стресу на системному і місцевому рівнях, з переважанням легеневого «респіраторного вибуху».

Перспективи подальших досліджень. Наслідком окиснювального стресу та накопичення АФК може бути збільшення кількості клітин зі зниженим мітохондріальним трансмембранним потенціалом. В майбутньому планується дослідження мітохондріального трансмембранного потенціалу, що відображає функціонально-метаболічний стан клітини.

ЛІТЕРАТУРА

1. Заббарова И. В. Активные формы кислорода и азота в митохондриях сердца и модельных системах / И. В. Заббарова // Автореф. дис. канд. мед. наук – Москва. – 2004. – 20 с.
2. Курик Л. М. Фізико-хімічні аспекти синглетно-кисневої терапії у лікуванні патологічних процесів / Л. М. Курик // Український пульмонологічний журнал. – 2006. – № 1. – С. 66–68.
3. Чорна М. В. Вплив металокомплексу тирозинату цинку та ентеросорбенту „Фібрабет” на генерацію активних форм кисню та окиснювальну модифікацію білків у щурів, уражених хлоридами кадмію та кобальту / М. В. Чорна // Медична хімія. – 2008. – Т. 10, № 4. – С. 118–122.
4. Абдрахманова Л. М. Особенности экспрессии активных форм кислорода клетками крови у больных хроническим бронхитом / Л. М. Абдрахманова, У. Р. Фархутдинов, Р. Р. Фархутдинов // Терапевтический архив. – 2001. – № 3. – С. 45–48.
5. Колісник М. І. Активні форми кисню та їх роль у метаболізмі клітини / М. І. Колісник, Г. В. Колісник, Є. Нідзюлка, В. В. Влізло // Біологія тварин. – 2009. – Т. 11, № 2. – С. 59–70.
6. Болдырев А. А. Биомембранология / А. А. Болдырев, Е. И. Кяйвярайнен, В. А. Шлюха. – Петрозаводськ : Изд-во Кар. НЦРАН, 2006. – 226 с.
7. Нейко Є. М. Кисеньзалежні функції фагоцитів у хворих на хронічне обструктивне захворювання легень / Є. М. Нейко, П. Р. Герич, М. М. Островський, Л. М. Томащук // Здобутки клінічної і експериментальної медицини. – 2010. – №1. – С. 100–104.
8. Вплив інтервальних гіпоксично-гіпероксичних тренувань на марганцеву супероксиддисмутазу міокарда щурів / М. М. Стешенко, Т. І. Древицька, О. О. Гончар, І. М. Маньковська // Буковинський медичний вісник. – 2011. – Том 15, № 3 (59). – С. 246–249.
9. Павлов С. В. Мітопротективна дія тільних антиоксидантів в умовах моделювання нітрозуючого стресу IN VITRO / С. В. Павлов // Здобутки клінічної і експериментальної медицини. – 2011. – №2. – С. 95–97.
10. Fallon M. B. Common bile duct ligation in the rat: a model of intrapulmonary vasodilatation and hepatopulmonary syndrome / M. B. Fallon, G. A. Abrams, J. W. McGrath [et al.] // Am. J. Physiol. – 1997. – Vol. 272. – P. 779–784.
11. Zhang Hui-Ying Multiple pathogenic factor-induced complications of cirrhosis in rats: A new model of hepatopulmonary syndrome with intestinal endotoxemia / Hui-Ying Zhang, De-Wu Han, Zhong-Fu Zhao, Ming-She Liu, Yan-Jun Wu, Xian-Ming Chen, Cheng Ji // World J. Gastroenterology. – 2007. – Vol. 13 (25). – P. 3500–3507.
12. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. – Council of Europe. Strasbourg. – 1986. – № 123. – 52 p.
13. Самсонова М. В. Стандартные цитопрепараты бронхоальвеолярного лаважа в исследовании и патологии легких / М. В. Самсонова, А. Л. Черняев // Лаборатория. – 1997. – № 6. – С. 18–21.
14. Чичахов Д. А. Выделение альвеолярных макрофагов из бронхоальвеолярной лаважной жидкости у новорождённых на градиенте перколлы / Чичахов Д. А., Пулин А. М. // Материалы IX Конгресса педиатров России. – М, 2003. – С. 313–314.
15. Роль цитокинов в редокс-зависимой регуляции апоптоза / О.Е. Чечина, А.К. Биктасова, Е. В. Сазонова [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2009. – № 2. – С. 67–72.
16. Куликов В. Ю. Роль окислительного стресса в регуляции метаболической активности внеклеточного матрикса соединительной ткани (обзор) / В. Ю. Куликов // Медицина и образование в Сибири. – № 4. – 2009. – С. 47–8.
17. Механизмы апоптоза лимфоцитов при клещевом энцефалите / О. Е. Чечина, Н. В. Рязанцева, Е. В. Сазонова [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2011. – № 6. – С. 61–66.
18. Крюков А. А. Генерация активных форм кислорода в моноцитах при адгезии к стеклу / А. А. Крюков, Г. Н. Семенов, С. Н. Черенкевич // Цитология. – 2006. – Т. 48, № 2. – С. 142–148.
19. Brown K. E. Immunohistochemical detection of myeloperoxidase and its oxidation products in kupffer cells of human liver / K. E. Brown, E. M. Brunt, J. W. Heinecke // Amer. J. Pathol. 2001. Vol. 159 : 2081–2089.
20. Thelen M. Neutrophil signal transduction and activation of the respiratory burst / M. Thelen, B. Dewald, M. Baggiolini // Physiol. Rev. – 1993. – Vol. 73. – P. 797–815.
21. Девина Э. А. Влияние сигаретного дыма на компоненты оксидантно-антиоксидантной системы в альвеолярных макрофагах / Э. А. Девина, Т. Ю. Принькова, А. Д. Таганович // Лабораторна діагностика. – 2010. – №1 (51). – С. 10–14.

THE ROLE OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN THE DEVELOPMENT OF EXPERIMENTAL HEPATOPULMONARY SYNDROME

©I. Ya. Krynytska

SHEI «Ternopil State Medical University by I. Ya. Horbachevsky»

SUMMARY. The influence of two experimental models of hepatopulmonary syndrome on the generation of reactive oxygen species by monocytes of whole blood and alveolar macrophages of bronchoalveolar lavage was studied. It was determined, that in rats of both experimental groups is significant increase of generation of reactive oxygen species.

KEY WORDS: hepatopulmonary syndrome, reactive oxygen species, monocytes, alveolar macrophages.