

## СПЕЦИФІКА СИНТЕЗУ ЕНДОТЕЛІОЦИТАМИ НІТРОЗОГЛУТАТІОНУ В УМОВАХ IN VITRO ПРИ ЗМОДЕЛЬОВАНІЙ ХРОНІЧНІЙ ІМУНОКОМПЛЕКСЕМІЇ

©О. В. Садляк

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

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

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** оксид азоту, нітрозоглутатіон, хронічна імунокомплексемія, ендотеліоцити, корвітин.

**Вступ.** Загальновідомо, що алергічні та запальні процеси, обумовлені дією цитокінів, індують підвищений NOS-залежний синтез оксиду азоту в цілому організмі з переважанням індукцйбельної NO-синтази [8]. 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 [4, 5].

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

**Матеріал і методи дослідження.** Експериментальні дослідження проводили на 20 статевозрілих щурах-самцях масою 200–250 г. Моделювання ХІК створювали за допомогою класичної моделі Cochrane C. і Kofler D. [10]. Евтаназію тварин здійснювали шляхом декапітації (комісія з питань біоетики при ЛНМУ ім. Данила Галицького, протокол № 15 від 12.12.2005 р.).

Розчин корвітину вводили внутрішньоочеревинно в дозі 40 мг/кг раз на добу впродовж 10 днів [9, 11, 12]. Розвиток ХІК оцінювали у сироватці крові за рівнем ЦІК, визначення яких проводили за допомогою методу [7]. Оцінку загальної комплементарної активності сироватки крові визначали за методом [1]. Виділення ендотеліальних клітин черевного відділу аорти білих щурів проводили за допомогою ферментативного диспергування [3], а інкубацію проводили у середовищі 199 з 20 % вмістом телячої ембріональної сироватки, в термостаті при 37 °С в атмосфері із 5 % CO<sub>2</sub> впродовж 1 год. Розчин корвітину вносили в лунку планшети, дозу застосування визначали на підставі літературних даних [6, 14]. Визначення сумарної активності NOS проводили спектрофотометричним методом [2], а вміст нітрозоглутатіону визначали в білкових аліквотах проб [13]. Отримані результати обробляли за допомогою комп'ютерної програми Microsoft Excel.

**Результати й обговорення.** Проведені дослідження встановили – ферментативна активність NO в ендотеліальних клітинах при інкубації без лімфоцитів і в їх присутності за умов норми (табл. 1) є наступною: зростає майже у 2 рази рівень NOS (P<0,001), паралельно із цим вміст GSNO зменшується 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), порівняно з контролем. Відносно контрольного рівня спостерігається зниження 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±10,14) нмоль/мг білка (P<0,001), а в умовах сумісної інкубації з лімфоцитами на 63,8 %, до (134,56±11,02) нмоль/мг білка (P<0,001).

У ендотеліоцитах інтактних тварин за умов їх інкубації з лімфоцитами (рис. 1) спостерігаємо незначне підвищення вмісту нітрозоглутатіону. У ендотеліоцитах, інкубованих з лімфоцитами у присутності корвітину, прослідковується тенденція до підвищення вмісту GSNO.

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

**Висновки.** 1. Аналіз кооперації клітин ендотелію у тварин із хронічною імунокомплексемією показав різке зниження GSNO, що може бути розцінено як розвиток нітрозактивного стресу в досліджуваних клітинах і є свідченням зниження системи антиоксидантного захисту за цих умов.

Таблиця 1. Показники активності NOS та 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

Примітки:  $P_1$  – 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.

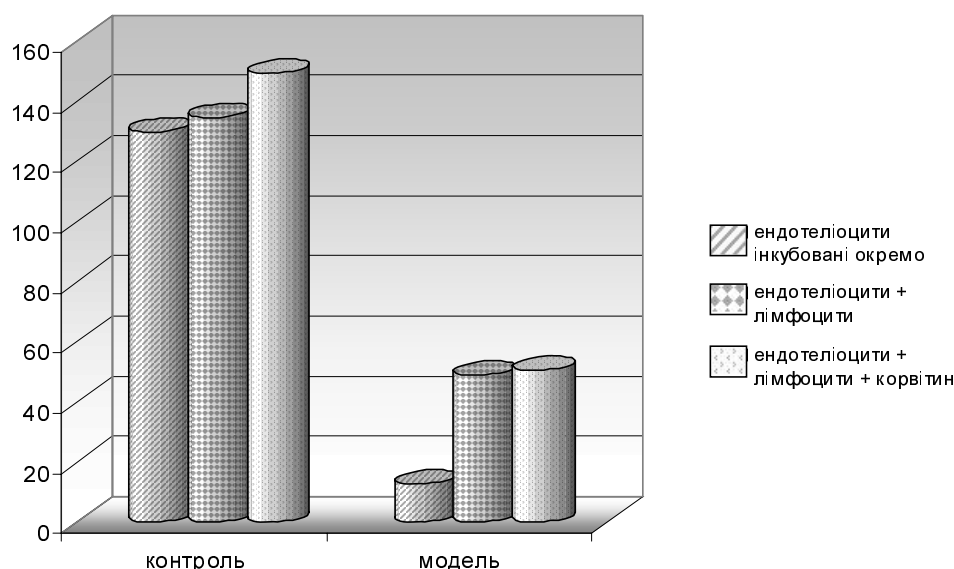


Рис. 1. Вплив корвітину на показники вмісту GSNO у ендотеліоцитах інтактних і дослідних тварин до і після їх інкубації з лімфоцитами.

2. Корвітин в умовах *in vitro*, проявляючи інгібуючий вплив на розвиток нітрозактивного стресу в ендотеліоцитах, зумовлює відновлення порушеного балансу в метаболізмі оксиду азоту.

**Перспективи подальших досліджень.** Концентрація стабільного метаболіту оксиду азоту – GSNO, прямо залежить від ступеня активності патологічного процесу і є показником адаптації і антиоксидантної спроможності клітин при патологічних станах. Отже, за рівнем у крові цього метаболіта можна оцінювати розвиток захворювання і контролювати ефективність лікувальних заходів.

Застосування корвітину, препарату із потужною антиоксидантною спроможністю, здатністю до гальмування активності мембранотропних ферментів і активацією чи збереженням рівня оксиду азоту в пошкоджених тканинах та крові дає підстави для подальшого експериментального дослідження, з метою корекції порушень даної системи при хронічній імунотоксичності.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Вільхова Т. К. Переваги методу кількісного визначення рівня циркулюючих імунних комплексів / Т. К. Вільхова, А. М. Гаврилюк, А. С. Кульчицька // X Конгрес СФУЛТ : тези доповідей. – Чернівці-Київ-Чикаго, 2004. – С. 386.
2. Викторов И. В. Роль оксида азота и других свободных радикалов в ишемической патологии мозга / И. В. Викторов // Вестн. Рос. АМН. – 2000. – № 4. – С. 5–10.
3. Ендотеліальні клітини за умов культивування (порівняльний аналіз методичних підходів) / Т. Н. Ковален-

- ко, О. І. Осадченко. І. Р. Ніконенко, Т. Г. Скібо // Фізіол. журнал. – 1999. – Т. 45, № 4. – С. 120–124.
4. Л. Ф. Коноплева. Ендотеліальна дисфункція в патогенезі серцево-судинних захворювань і методи її корекції // Therapia – № 3 (56). – 2011. – С. 26–31.
5. Макаров М. А. Роль дисфункції ендотелію і регідності артерій в патогенезі хронічної обструктивної хвороби легких / М. А. Макаров, С. Н. Авдеев, А. Г. Чучалин // Терапевтический архив. – 2012. – № 3. – С. 74–80.

Огляди літератури, **оригінальні дослідження**, погляд на проблему

6. Мойбенко А. А. Эффективность водорастворимой формы кверцетина (корвитина) при лечении острого коронарного синдрома с элевацией сегмента ST / А. А. Мойбенко, А. И. Пархоменко, С. Н. Кожухов // Журнал АМН України. – 2003. – Т.9, №2. – С. 361–370.
7. Методы определения иммунных комплексов / С. Г. Осипов, В. В. Еремеев, В. И. Руднев // Лаб. дело. – 1983. – №11. – С. 3–7.
8. Сепиашвили Р. И. Функциональная система иммунного гомеостаза / Р. И. Сепиашвили // Аллергология и иммунология – 2003. – Т.4, №2. – С. 5–14.
9. Флавоноїд кверцетин: фармакологічні властивості та клінічне застосування / М. Т. Ватутін, Т. С. Гончаренко, О. В. Склянка, С. Вакхама // Ліки. – 2005. – № 3–4. – С. 19–27.
10. Cochrane C. G. Immune complex in experimental animal and man / С. G. Cochrane, D. Koffer // *Advanc. Immunol.* – 1973. – Vol. 16. – P. 185–204.
11. Cytoprotective effect of green tea extract and quercetin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress / Jeong Y. M., Choi Y. G., Kim D. S. [et al.] // *Arch. Pharm. Res.* – 2005. – Vol. 28(II). – P. 1251–1256.
12. Effekt of three flavonoids isolated from Japanese Polygonum species on superoxide generation in human neutrophils / G. Lur, W. Wang, N. Masuoka, T. Asobe, K. Yanashita [et al.] // *Planta Med.* – 2005. – Vol. 71(10). – P. 933–937.
13. Gerdel D. Ingibition of the catalytic activity of aldehyde dehydrogenase by NO is associated with S – nitrosylation and the release of zinc / D. Gerdel A. J. Gederbaum // *Biochemistry.* – 1996. – Vol. 35, № 50. – P. 16186–16194.
14. Liposomal quercetin efficiently suppresses growth of solid tumors in murine models / Yuan Z., Chen L., Fan L. [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2006. – Vol. 12. – P. 3193–3199.

## **SPECIFIC OF THE SYNTHESIS OF ENDOTHELICYTES OF NITROZOGLUTATION IN VITRO UNDER CONDITIONS OF THE MODELING CHRONIC IMMUNOCOMPLEXEMI**

**©O. V. Sadlyak**

*Lviv National Medical University by Danylo Halytskyi*

**SUMMARY.** The aim of our work was to study the characteristics of the synthesis of nitrozo-glutination in endothelial cells of white rats with experimental chronic immunocomplexemia and determine correction influence of corvitini on these processes. Analysis of incubation interaction of endothelial cells of animals with CIU showed a sharp decrease in GSNO in all test sites, 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:** nitric oxide, nitrozo-glutination, chronic immunocomplexemia, endothelial cell, Corvitini.