

- Immunology. 2011. - Vol. 133 (1). - P. 84-93.
- Nucleotide-binding oligomerization domain-2 modulates specific TLR pathways for the induction of cytokine release / M. Netea, G. Ferwerda, D. de Jong, T. Jansen [et al.] // J. Immunol. - 2005. - Vol. 174. - P. 6518 - 6523.
- Pino S. The Role of Innate Immune Pathways in Type 1 Diabetes Pathogenesis / Pino S., Kruger A., Bortell R. // Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes. - 2010. - Vol. 17 (2). - P. 126 - 130.
- Salek-Ardakani S. T cells need Nod too? / S. Salek-Ardakani, M. Croft // Nat. Immunol. - 2009. - Vol. 10 (12). - P. 1231 - 1233.
- Stetson D. T helper 17 cells get the NOD / D. Stetson, R. Medzhitov // Immunity. - 2007. - Vol. 27 (4). - P. 660 - 669.
- Strober W. NOD2, an intracellular innate immune sensor involved in host defense and Crohn's disease / W. Strober, T. Watanabe // Mucosal Immunol. - 2011. - Vol. 4 (5). - P. 484 - 495.
- T cell-intrinsic role of Nod2 in promoting type 1 immunity to *Toxoplasma gondii* / M. Shaw, T. Reimer, C. Sanchez-Valdeperas [et al.] // Nat. Immunol. - 2009. - Vol. 10 (12). - P. 1267 - 1274.
- The pathogen recognition receptor NOD2 regulates human FOXP3⁺ T cell survival / M. Rahman, E. Midtling, P. Svingen [et al.] // J. Immunol. - 2010. - Vol. 184 (12). - P. 7247 - 7256.
- Zhong Y. Functions of NOD-Like Receptors in Human Diseases / Y. Zhong, A. Kinio, M. Saleh // Front Immunol. - 2013. - Vol. 16. № 4. - P. 333 - 338.

Деген А.С., Камышный А.М.

ХАРАКТЕРИСТИКА РАСПРЕДЕЛЕНИЯ NOD ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА В КАЛТ КРЫС ПРИ ЭСД И ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ПЕНТОКСИФИЛЛИНА

Резюме. В эксперименте изучалось влияние экспериментального сахарного диабета на интенсивность экспрессии внутриклеточного рецептора врожденного иммунитета NOD2 иммунными клетками подвздошной кишки. Для определения NOD2⁺-клеток был использован метод непрямой иммунофлюоресценции с использованием моноклональных антител к NOD2 крыс. Установлено, что развитие диабета сопровождалось увеличением количества NOD2⁺-клеток в кишечнике на 37% - 45% на 14 день, но к 4 неделе заболевания их количество возвращалось к контрольным показателям. Индукция диабета приводила к увеличению концентрации NOD2 на 7 - 28% в макрофагах и дендритных клетках и уменьшению на 8 - 12% в лимфоцитах. Введение диабетическим животным пентоксифиллина приводило к уменьшению суммарной плотности популяции NOD2⁺-клеток на 14-й день развития ЭСД на 29% (СПСОВ) 42% (ИЛФ), но на 4-ой неделе эти показатели восстанавливались до контрольных в СПСОВ и превышали их на 29% в ИЛФ. При этом концентрация NOD2 также снижалась на 2-й неделе развития диабета на 8-15% у NOD2⁺-макрофагов и NOD2⁺-дендритных клеток.

Ключевые слова: диабет, NOD-подобные рецепторы, кишечно-ассоциированная лимфоидная ткань.

Degen A.S., Kamyshny A.M.

DISTRIBUTION CHARACTERISTICS OF NOD-LIKE RECEPTORS OF INNATE IMMUNITY IN GALT OF RATS AT AN EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS AND PENTOXIFILLINE ADMINISTRATION

Summary. It was study the peculiarities of NOD2 receptors in gut associated lymphoid tissues (GULT) of rats with experimental STZ-induced diabetes mellitus and pentoxifilline (PTX) administration. Structure of population of NOD2⁺-cells has been studied by the analysis of serial histological sections using the method of indirect immunofluorescence with monoclonal antibodies to NOD2 of rat. It has been established that diabetes development was accompanied with 37% - 45% ($p < 0,05$) increase in quantity of NOD2-cells on the 14th day, but by the 4th week of disease their number returned to the benchmarks. Induction of diabetes leads to increased in concentrations of NOD2 on 7 - 28% in macrophages and dendritic cells and a decrease on 8 12% in lymphocytes. PTX administration of diabetic animal reduces the quantity of NOD2⁺-cells on 29% ($p < 0,05$) in mucous membrane of villus 42% in subepithelial zone of ILF by the 14th day of experimental diabetes mellitus. But by the 4th week of disease their number returned to the benchmarks in mucous membrane of villus and in subepithelial zone of ILF it increase on 29%. The concentration of NOD2 also decreased in 2nd week of diabetes on 8 - 15% in NOD2⁺-macrophages and NOD2⁺-dendritic cells.

Key words: diabetes, NOD2-like receptors, gut-associated lymphoid tissue.

Стаття надійшла до редакції 10.04.2014 р.

Деген Анна Сергіївна - асистент кафедри мікробіології, вірусології та імунології Запорізького державного медичного університету; +38 067 935-45-83

Камышный Александр Михайлович - д. мед. н., доцент, завідувач кафедри мікробіології, вірусології та імунології Запорізького державного медичного університету; +38 061 234-26-31

© Добровольська Р.А., Гошовська Ю.В., Шиманська Т.В., Сагач В.Ф.

УДК: 612.17

Добровольська Р.А., Гошовська Ю.В., Шиманська Т.В., Сагач В.Ф.

Інститут фізіології імені О.О. Богомольця НАНУ, відділ фізіології кровообігу (вул. акад. Богомольця, 4, м. Київ, Україна, 01024)

ВПЛИВ РІЗНИХ ШЛЯХІВ МЕТАБОЛІЗМУ L-ЦИСТЕЇНУ НА РЕЗИСТЕНТНІСТЬ МІОКАРДА ДО ІШЕМІЇ-РЕПЕРФУЗІЇ

Резюме. В експериментах на ізольованому за Лангендорфом серці щурів показано, що блокада перетворення L-цистеїну в H₂S за допомогою пропаргілгліцину призводила до запобігання постішемічних порушень функції серця і неефективного використання кисню міокардом внаслідок зменшення проникності мітохондріальних мембран. Кардіопротекторний ефект був зумовлений формуванням із L-цистеїну глутатіону, оскільки введення блокатора його синтезу DL-бутіонін-S,R-

сульфоксиміну повністю нівелювало захисний ефект пропаргілгліцину + L-цистеїну.

Ключові слова: L-цистеїн, сірководень, ішемія-реперфузія, серце, глутатіон, пропаргілгліцин, бутіонінсульфоксимін.

Вступ

Дослідження останніх років показали, що сірководень (H_2S), відомий як третя газоподібна сигнальна молекула наряду з NO та CO, відіграє важливу роль в регуляції функціонування серцево-судинної системи. Він спричинює ендотелій-залежне розслаблення судин [Yang et al., 2008], попереджує запалення [Li et al., 2007], стимулює ангиогенез [Klöhn et al., 2012; Polhemus et al., 2013] тощо. Кардіопротекторний ефект в умовах ішемічного пошкодження міокарду спостерігали при застосуванні широкого діапазону доз екзогенних донорів H_2S [Johansen et al., 2006; Bliksoen et al., 2008, Shymanska et al., 2013], однак про ендогенний сірководень відомо мало. В організмі H_2S утворюється із L-цистеїну [Wang et al. 2002] ферментами цистатіонін- β -синтазою (CBS), цистатіонін- γ -ліазою (CSE), що представлені в цитоплазмі, та 3-меркаптопіруват сульфур-трансферазою (3MST) - мітохондріальним ферментом. Відомо, що введення L-цистеїну в умовах ішемічного пошкодження серця зменшує зону інфаркту міокарда та стимулює систему антиоксидантного захисту [Eisey et al., 2010, Xue et al., 2011], однак перетворення L-цистеїну на сірководень - не єдиний шлях метаболізму цієї амінокислоти і достеменно не відомо, за рахунок якого саме механізму здійснюється захисний ефект. Метою нашої роботи стало вивчення впливу L-цистеїну на ішемічне порушення функції серця в умовах інгібування синтезу сірководню.

Матеріали та методи

Експерименти проводили на дорослих самцях щурів лінії Wistar, що утримувались на стандартному раціоні віварію Інституту фізіології ім.О.О.Богомольця, з дотриманням вимог Європейської конвенції з роботи з тваринами (Страсбург, 1986). Тварин було розділено на експериментальні групи: 1) контрольну; 2) попередник синтезу сірководню L-цистеїн ("Sigma" USA, 121 мг/кг в/о, 30 хв); 3) незворотній інгібітор CSE пропаргілгліцин (ПАГ, "Sigma", USA, 11.3 мг/кг в/о, 30 хв); 4) послідовне введення ПАГ+L-цистеїн (10 хв + 30 хв, в/о); 5) застосування блокатору утворення глутатіону DL-бутіонін-S,R-сульфоксиміну ("BSO, Sigma" USA, 22,2 мг/кг в/о) за схемою ПАГ+BSO+L-цистеїн (1 хв+ 10 хв + 30 хв, в/о). Перфузію коронарних судин здійснювали за методом Лангендорфа в умовах постійного тиску з подальшим відтворенням моделі ішемії-реперфузії (20/40 хв). Досліджували пост-ішемічне відновлення наступних показників кардіодинаміки: тиску, що розвивав лівий шлуночок серця (Рлш), його першої похідної (dP/dt_{min} , dP/dt_{max}), частоти серцевих скорочень (ЧСС), коронарного потоку (КП), парціального тиску кисню в притікаючому та відтікаючому від серця розчині (pO_2). Розраховували кисневу вартість роботи серця (КВ) як співвідношення між споживан-

ням кисню (за Neely) та роботою серця (Рлш x ЧСС). Для оцінки ступеня проникності мітохондріальних мембран і виявлення мітохондріального фактора, який зумовлює характерний пік екстинкції при довжині хвилі 245-250 нм і може бути маркером відкриття мітохондріальних пор в умовах *in situ* та *in vivo* за допомогою спектрофотометра ($\lambda = 230-260$ нм) реєстрували оптичну густину розчину, що відтікав від серця до ішемії і за 1 хв. реперфузії [Сагач та ін., 2003]. Статистичний аналіз даних проводили з використанням критерію Манна-Уїтні.

Результати. Обговорення

Введення L-цистеїну зменшувало ступінь ішемічного порушення функції міокарда порівняно з результатами контрольної серії (рис. 1). Величина КП та Рлш до 40-ої хвилини реперфузії відновлювались на 60% порівняно з доішемічним періодом. Максимальний позитивний ефект L-цистеїну спостерігали на 10-й хвилині реперфузії. Киснева вартість роботи серця, як показник ефективності утилізації кисню міокардом, в цей період знизилась лише на 20%, що підтверджує позитивний вплив попереднього введення L-цистеїну на відновлення функції серця при ішемії-реперфузії.

Застосування ПАГ перед моделюванням ішемії супроводжувалося зниженням кінцево-діастолічного тиску, а Рлш мав стійку тенденцію до зростання протягом всього періоду реперфузії. Однак, інші показники цієї дослідної серії статистично не відрізнялись від таких в контрольній. Таким чином, як L-цистеїн, так і ПАГ мали невеликий позитивний вплив на реперфузійне відновлення функції серця.

На відміну від цього, попереднє послідовне введення ПАГ+L-цистеїн спричиняло потужний кардіопротекторний ефект, що проявлявся у відсутності ішемічної контрактури. Спостерігали значне запобігання реперфузійних змін усіх досліджуваних показників функціонального стану міокарда (рис. 1). До кінця реперфузійного періоду Рлш дорівнював $92 \pm 5,3\%$ порівняно з $30 \pm 9,4\%$, в контрольній серії ($p < 0,05$), а швидкість зростання dP/dt_{max} і зниження dP/dt_{min} тиску у лівому шлуночку становила відповідно 104% та 93%, порівняно з 43% та 39% в контрольній групі ($p < 0,05$). Робота серця відновлювалася до 98% на 40-й хв. реперфузії. КВ роботи серця цих тварин не зазнавала значних змін в постішемічний період, тоді як в контрольній групі її підвищення становило 240% вже на 10-й хв. реперфузії. Це свідчить про більш ефективну утилізацію кисню міокардом дослідних щурів порівняно з контрольною групою. Сумісна дія ПАГ+L-цистеїну запобігала утворенню мітохондріальних пор, що підтверджується зниженням вивільнення мітохондріального фактора (рис. 1).

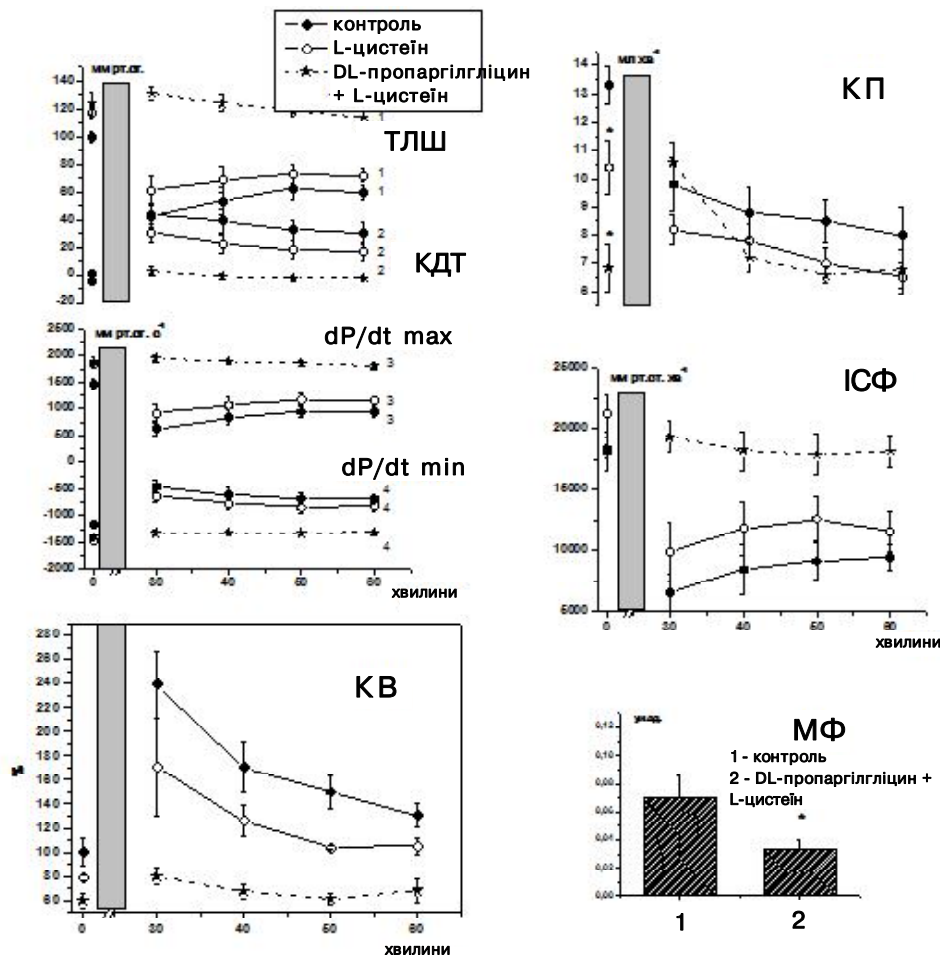


Рис. 1. Кардіопротекторний ефект попередника синтезу сірководню на фоні блокади одного з ферментів його синтезу цистатіонін γ -ліази.

Варто зазначити, що спостережуваний кардіопротекторний ефект значною мірою був зумовлений де novo формуванням глутатіону, оскільки введення блокатора його синтезу БСО повністю нівелювало захисний ефект ПАГ + L-цистеїну, наближаючи значення усіх показників кардіодинаміки до таких у контрольній серії (рис. 2).

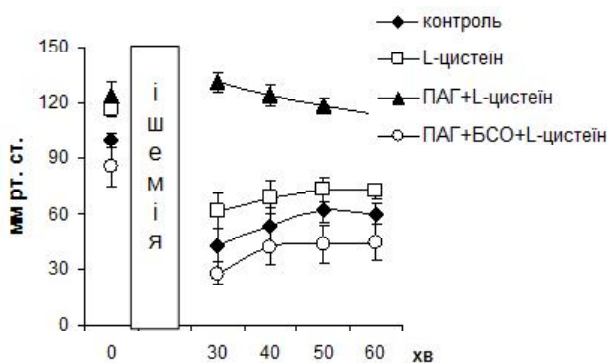


Рис. 2. Зміни тиску у лівому шлуночку за дії L-цистеїну на фоні блокади глутатіону та сірководню.

За нашими даними блокада перетворення L-цистеїну в H_2S за допомогою ПАГ призвела до запобігання постішемічних порушень функції серця і неефективного використання кисню міокардом. Застосування комбінації цих сполук до ішемії-реперфузії призводило до зменшення проникності мембран мітохондрій, що дозволило більш ефективно використовувати кисень дихальним ланцюгом із збереженням енергопродуруючої функції мітохондрій і підвищенням стійкості міокарда до викликаного ішемією окисного стресу.

Відомо, що цілісність мембран мітохондрій забезпечується ефективною роботою системи антиоксидантного захисту - ферментами супероксиддисмутазою, каталазою і глутатіоном. Повідомляється, що H_2S підвищує активність супероксиддисмутази в

серцях щурів за умов травматичного геморагічного шоку [Chai et al., 2011]. Вживання кардіоміоцитів після ішемії збільшувалось у присутності екзогенного сірководню внаслідок підвищення активності супероксиддисмутази і глутатіонпероксидази [Sun et al., 2012].

За нашими даними спрямування L-цистеїну на синтез глутатіону внаслідок блокування ПАГом його перетворення у H_2S супроводжувалося збільшенням резистентності міокарда до ішемічного впливу, що підтверджувалося високим ступенем відновлення функції серця після ішемії. Ми припускаємо, що позитивний вплив комбінації ПАГ + L-цистеїн при ішемії може бути пов'язаний також з активацією NO- або H_2S -синтезу через 3-меркаптопириват сульфуртрансферазу.

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Реперфузійні порушення функції серця істотно зменшувалися при введенні L-цистеїну на фоні блокади цистатіонін- γ -ліази. Одним зі шляхів цього позитивного впливу було запобігання утворенню мітохондріальних пор.

2. Введення блокатора синтезу глутатіону нівелювало захисний ефект комбінації сполук ПАГ + L-цистеїн.

Результати дослідження свідчать, що ендогенний

H₂S модулює стійкість міокарда до ішемії-реперфузії, а система ферментів, що бере участь у синтезі H₂S, може бути терапевтичною мішенню в боротьбі з реперфузійними пошкодженнями серця.

Список літератури

- Sagach V. F. Фактор, який вивільнюється під час реперфузії ішемізованого серця, може бути маркером відкриття мітохондріальної пори / В. Ф. Сагач, Т. В. Шиманська, С. М. Надточій // Фізіол. журн. - 2003. - № 4. - С. 6 - 12.
- Anti-inflammatory and gastrointestinal effects of a novel diclofenac derivative / L. Li, G. Rossoni, A. Sparatore [et al.] // Free Radic. Biol. Med. - 2007. - № 5. - P. 706 - 19.
- Bliksoen M. Effects of hydrogen sulphide on ischaemia-reperfusion injury and ischaemic preconditioning in the isolated, perfused rat heart / M. Bliksoen, M. L. Kaljusto, J. Vaage, K. O. Stenslokken // Eur. J. Cardiothorac. Surg. - 2008. - № 34. - P. 344 - 9.
- Effect of Hydrogen Sulfide on Reactions of Isolated Rat Heart under Volume Load and Ischemia-Reperfusion / T. Shimanskaya, Y. Goshovska, O. Semenikhina [et al.] // Int. J. Phys. Pathophys. - 2013. - № 3. - P. 1 - 12.
- Elsley D. J. L-cysteine stimulates hydrogen sulfide synthesis in myocardium associated with attenuation of ischemia-reperfusion injury / D. J. Elsey, R. C. Fowkes, G. F. Baxter // J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther. - 2010. - № 1. - P. 53 - 59.
- Exogenous hydrogen sulfide protects against traumatic hemorrhagic shock via attenuation of oxidative stress / W. Chai, Y. Wang, J. Y. Lin [et al.] // J. Surg. Res. - 2011. - №1. - P. 210 - 219.
- H₂S as a physiologic vasorelaxant : Hypertension in mice with deletion of cystathionine γ -lyase / G. Yang, L. Wu, B. Jiang [et al.] // Science. - 2008. - Vol. 322. - P. 587 - 590.
- Hydrogen sulfide attenuates cardiac dysfunction after heart failure via induction of angiogenesis / D. J. Polhemus, K. Kondo, S. Bhushan [et al.] // Circ. Heart Fail. - 2013. - № 5. - P. 1077 - 86.
- Hydrogen sulfide decreases the levels of ROS by inhibiting mitochondrial complex IV and increasing SOD activities in cardiomyocytes under ischemia/reperfusion / W.-H. Sun, F. Liu, Y. Chen [et al.] // Biochem. and Biophys. Res. Commun. - 2012. - № 2. - P. 164 - 169.
- Hydrogen sulfide: potent regulator of vascular tone and stimulator of angiogenesis / C. Klöhn, G. Dubrovskaya, Y. Huang [et al.] // Int. J. Biomed. Sci. - 2012. - Vol. 8, №2. - P. 81 - 6.
- Johansen D. Exogenous hydrogen sulfide (H₂S) protects against regional myocardial ischemia-reperfusion injury - evidence for a role of K-ATP-channels / D. Johansen, K. Ytrehus, G. F. Baxter // Basic Res. Cardiol. - 2006. - № 101. - P. 53 - 60.
- Wang R. Two's company, three's a crowd: can h₂s be the third endogenous gaseous transmitter? / R. Wang // FASEB J. - 2002. - Vol. 16. - P. 1792 - 1798.
- Xue M. Effect of S-allyl-L-cysteine on isolate heart subject to ischemia/reperfusion / M. Xue, J. Cui, W. Xia [et al.] // Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi. - 2011. - № 1. - P. 13 - 17.

Добровольская Р.А., Гошовская Ю.В., Шиманская Т.В., Сагач В.Ф.

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ПУТЕЙ МЕТАБОЛИЗМА L-ЦИСТЕИНА НА РЕЗИСТЕНТНОСТЬ МИОКАРДА К ИШЕМИИ-РЕПЕРFUЗИИ

Резюме. В экспериментах на изолированных по методу Лангендорфа сердцах крыс показано, что блокада превращения L-цистеина в H₂S с помощью пропаргилглицина - ингибитора цистатионин- γ -лиазы, приводила к предотвращению постишемических нарушений функции сердца и неэффективного использования кислорода миокардом, что сопровождалось уменьшением проницаемости митохондриальных мембран. Кардиопротекторный эффект был обусловлен синтезом из L-цистеина глутатиона, поскольку введение блокатора его синтеза DL-бутионин-S,R-сульфоксимины полностью нивелировало защитный эффект пропаргилглицина+ L-цистеина.

Ключевые слова: L-цистеин, сероводород, ишемия-реперфузия, сердце, глутатион, пропаргилглицин, бутионинсульфоксимин.

Dobrovolska R.A., Goshovska Y.V., Shymanska T.V., Sagach V. F.

EFFECT OF DIFFERENT PATHWAYS OF L-CYSTEINE ON MYOCARDIAL RESISTANCE TO ISCHEMIA-REPERFUSION

Summary. In the experiments on isolated by Langendorff rat's hearts have been shown that blockade of L-cysteine conversion to H₂S using DL-propargylglycine - an inhibitor of cystathionine- γ -lyase resulted in the prevention of post-ischemic cardiac dysfunction which was accompanied by a decrease in mitochondrial membrane permeability. The cardioprotective effect was due to the synthesis of glutathione from L-cysteine, since its synthesis blocker DL-buthionine-S,R-sulfoximine completely diminished the protective effect propargylglycine + L-cysteine.

Key words: L-cysteine, hydrogen sulfide, ischemia-reperfusion, heart, glutathione, DL-propargyl glycine, DL-buthionine-(S,R)-sulfoximine.

Стаття надійшла до редакції 11.04.2014р.

Добровольська Раїса Андріївна - аспірант відділу фізіології кровообігу Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця НАНУ; +38 044 256-24-85; raysik@yandex.ru

Гошовська Юлія Володимирівна - к. біол. н., науковий співробітник відділу фізіології кровообігу Інституту фізіології імені О.О. Богомольця НАНУ; +38 044 256-24-85; raysik@yandex.ru

Шиманська Тетяна Віталіївна - к. біол. н., ст. науковий співробітник відділу фізіології кровообігу Інституту фізіології імені О.О. Богомольця НАНУ; +38 044 256-24-85

Сагач Вадим Федорович - член-кор НАНУ, зав. відділом фізіології кровообігу Інституту фізіології імені О.О. Богомольця НАНУ; +38 044 256-24-85