УДК: 616-002.77:612.1:57.088.6

У.П. ЄФРЕМОВА, Н.Е. ЛИЧКОВСЬКА, Р.В. ФАФУЛА, З.Д. ВОРОБЕЦЬ

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького
вул. Пекарська, 69, Львів, 79010

ОСОБЛИВОСТІ НІТРООКСИДСИНТАЗНОЇ АКТИВНОСТІ ЛІМФОЦИТІВ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ПРИ АНКІЛОЗИВНОМУ СПОНДИЛОАРТРИТІ

У статті наведено результати досліджень по вивченню ензиматичної активності нітрооксидсинтази лімфоцитів периферичної крові у донорів і хворих на анкілозивний спондилоартрит. Показано, що за умов розвитку ревматичної патології активність ендотеліальної форми ензиму знижується, а індуцибельної – різко зростає в порівнянні з практично здоровими донорами. Після проведеного лікування хворих у стаціонарі спостерігається наближення NO-синтазної активності до її контрольних значень.

Ключові слова: NO-синтаза, оксид азоту, ревматичні захворювання, анкілозивний спондилоартрит, лімфоцити

Ревматичні захворювання (РЗ) у всьому світі розглядають як одну з найпоширеніших патологій сучасного суспільства. За тяжкістю перебігу та вибору адекватного лікування вони одні з найскладніших [16]. Більшість хронічних запальних РЗ опосередковані в тому чи іншому ступені імунними порушеннями. Імунокомплексний процес багатокомпонентний, зв'язаний з особливостями і біологічними властивостями антигену і антитіл, їх співвідношенням і фізико-хімічними характеристиками. В основі цього процесу лежать генетично детерміновані аутоімунні процеси, виникненню яких сприяє дефіцит Т-супресорної функції лімфоцитів. Розвиток імунокомплексних процесів завжди супроводжується різноманітністю циркулюючих і локально депонуючих імунних комплексів (ІК). Однак, загальні закономірності механізмів імунокомплексних процесів зберігають визначальне значення, а специфіка хвороби залежить від властивостей ІК.

Проведені наукові дослідження останнього часу засвідчують, що процеси утворення та відкладання імунних комплексів залежать від рівня оксиду азоту (NO) в організмі та індукції активних форм кисню [18]. Тому імунорегуляторна роль оксиду азоту в імунокомплексних процесах та її вплив на міжклітинну кооперацію ефекторних і мішеневих клітин є об'єктом ґрунтовного вивчення участі NO-залежних механізмів у розвитку РЗ.

Утворення NO в організмі людини здійснюється в результаті окиснення атому азоту, що входить до складу амінокислоти L-аргініну під дією ензиму - нітрооксидсинтази (NOS). Виділяють три її ізоформи: нейрональну – NOS I (nNOS), індуцибельну (макрофагальну) - NOS II (iNOS) й ендотеліальну - NOS III (eNOS). Конститутивні ізоформи синтази NO (nNOS, eNOS) забезпечують синтез NO в фізіологічних умовах. iNOS в фізіологічних умовах неактивна. Синтез її відбувається у відповідь на дію патогенних стимулів [6, 9, 11, 12, 15, 19, 21]. Тому особливості функціонування і механізми регуляції індуцибельної ізоформи NOS залежать від характеру паталогічного процесу і ураженого органу [15].

Як конститутивні, так і індуцибельна ізоформи NO-синтази мають відношення до продукції оксиду азоту в ранній фазі запалення, при цьому проявляється їх прозапальний ефект. Пізня фаза запалення зв'язана з локальною лейкоцитарною активністю та інфільтрацією. В її розвиток вносить вклад тільки NO, продукований за участю iNOS, локалізованої в лейкоцитах [15].

Дослідження ензиматичного ряду лімфоцитів широко використовують при вивченні аутоімунних, імунодифіцитних, лімфопроліферативних та інших захворювань. Тому лімфоцити периферичної крові (ЛПК) можуть бути актуальною моделлю для вивчення певних патоморфологічних і біохімічних змін, які мають місце при ревматичних захворюваннях.

Мета роботи – оцінити зміни ензиматичної активності ендотеліальної та індуцибельної ізоформ NO-синтази у лімфоцитах периферичної крові донорів та хворих на анкілозивний спондилоартрит (АС) до та після лікування.

Матеріал і методи досліджень

Дослідження проводили на лімфоцитах периферичної крові хворих, які перебували на стаціонарному лікуванні у ревматологічному відділенні Львівської обласної клінічної лікарні. Групу контролю становили практично (клінічно) здорові донори, репрезентативні за віком і статтю

Моноядерні ЛПК людини виділяли з гепаринізованої свіжоотриманої венозної крові хворих і донорів у градієнті густини фікол-тріумбрасту (ρ = 1,08 г/см^3) [17]. Підраховували клітини у камері Горяєва, використовуючи як барвник 0,1% трипановий синій. Цілісність і життєздатність лімфоцитів, яка в усіх дослідах становила не менше 95%, оцінювали за забарвленням трипановим синім [20].

Визначення ензиматичної активності NO-синтази проводили на пермеабілізованих сапоніном ЛПК. Сапонін належить до групи речовин амфіфільної природи, що здатні зв'язуватися з мембранними білками гідрофобними зв'язками, одночасно взаємодіючи полярними групами з водою [3]. Це дає змогу молекулам детергенту розпушувати мембрану, водночас не порушуючи структури і функцій транспортувальних систем [14]. Для пермеабілізації мембран ЛПК та розкриття активності NO-синтази до суспензії лімфоцитів додавали сапонін доведений до кінцевої концентрації 0,2%. Дана методика грунтується на роботах, виконаних на еритроцитах, лімфоцитах і сперматозоїдах по вивченню йон-транспортувальних систем клітини раніше [8, 10]. Така модель також була успішно апробована при вивченні транспортувальних систем ЛПК (Na^+, K^+-АТФази, Ca^{2+}, Mg^{2+}-АТФази) та інших клітин [7].

Для тестування активності NO-синтази аліквоти пермеабілізованих сапоніном лімфоцитів інкубували в субстратній суміші наступного складу: трис-HCl –0,08 М (pH 7,4), $CaCl_2$ – 10 мМ, L-аргінін – 0,15 мМ, NADPH(H^+) – 0,12 мМ. Контрольні та безсубстратні зразки готували аналогічно до дослідних, але вони замість NADPH(H^+) та L-аргініну містили бідистильовану воду. Дослідні проби спектрофотометрували проти контрольних та безсубстратних зразків при 340 нм, після чого їх інкубували протягом 20 хв при 37^{o}C. Реакцію зупиняли внесенням до реакційного середовища $HClO_4$ (1,5 М). Активність NO-синтази виражали в наномолях окисненого NADPH(H^+)/хв на 1 мг загального протеїну у пробі [5]. Вміст білка у лімфоцитарній суміші визначали методом Лоурі [22].

Експериментальні дані обробляли методами варіаційної статистики. Варіаційно-статистичне опрацювання отриманих результатів проводили з використанням критерію Ст'юдента (t) за допомогою комп'ютерної програми Microsoft Excel 2003.

Результати досліджень та їх обговорення

На сьогодні доказана ключова роль NO в регуляції імунних реакцій організму і його участь практично на кожному етапі розвитку запалення. NO здійснює як прозапальну, так і протизапальну роль. Це зв'язано з тим, що розвиток запалення детермінований генерацією NO, синтезованого за участю iNOS. Одночасно NO-синтаза контролює біосинтез IL4, IL11, IL13, які відносяться до інгібіторів запальної реакції. Зміни інтенсивності синтезу NO притаманні організмам за дії різних факторів і змін умов середовища, оскільки ця багатофункціональна ефекторна молекула в багатьох випадках сприяє адаптації різних систем організму до шкідливих факторів впливу [2].

Різними авторами показана значна варіабельність ензиматичної активності NO-синтази ЛПК, що може бути обумовлено різноманітними методологічними підходами до вивчення активності ензиму [2, 4, 13].

В результаті проведених нами раніше досліджень з вивчення активності аргінази в ЛПК, яка конкурує з NO-синтазою за L-аргінін, у хворих на АС встановлено [1] зростання активності ензиму у 3,7 раза порівняно зі здоровими донорами. Після проведеного курсу лікування активність аргінази дещо знижується і наближається до її контрольних значень.

В результаті проведених досліджень з вивчення активності NO-синтази ЛПК встановлено, що активність даного ензиму ЛПК у практично здорових осіб становить 74,6±6,38 нмоль NADFH(H^+)/хв·мг білка (n=15). Так як iNOS в нормі практично відсутня, можна стверджувати про активність eNOS в ЛПК донорів. У хворих на АС ензиматична активність eNOS знижена стосовно донорів і становить 42,2±4,35 нмоль NADFH(H^+)/хв·мг білка (n=15) (рисунок). Одночасно iNOS зростає до 64,2±6,22 нмоль NADFH(H^+)/хв·мг білка.

NO-синтазну активність ЛПК хворих на АС визначали повторно після проведення лікування у стаціонарі. Спостерігається деяке зростання активності eNOS та значне зниження ензиматичної активності iNOS ЛПК хворих на АС. Так, значення eNOS після проведеного лікування становить 60,5±5,78 нмоль NADFH(H^+)/хв·мг білка, а iNOS - 21,67±2,86 нмоль NADFH(H^+)/хв·мг білка (рисунок). Таким чином, можна зробити припущення, що зниження активності iNOS свічить про незначне відновлення у функціонуванні лімфоцитів як імунокомпетентних клітин після проведеного лікування хворих у стаціонарі.

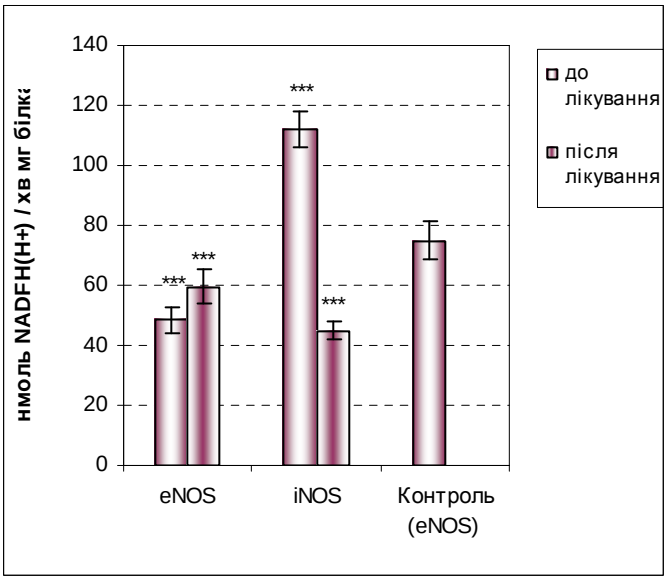

Рис. NO-синтазна активність лімфоцитів периферичної крові у хворих на анкілозивний спондилоартрит, нмоль NADFH(H^+)/хв·мг білка. (M ±m; n=15); *** різниця статистично достовірна (P<0,001) стосовно величин у лімфоцитах в осіб групи порівняння та стосовно величин у хворих на момент поступлення у стаціонар (у ряді після лікування)

Дослідниками показано, що за умов розвитку ревматичної патології спостерігається достовірне зниження Ca^{2+}, Mg^{2+}-АТР-ази плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулуму в 1,4 раза, що свідчить про зростання концентрації йонізованого кальцію в цитозолі [7]. Зміни ензиматичної активності NOS лімфоцитів периферичної крові у хворих на анкілозивний спондилоартрит може свідчити про зміни функціональної активності лімфоцитів, зумовлені порушеннями метаболічних процесів або можуть опосередковуватись через інші регуляторні механізми клітини.

Висновки

В результаті проведених досліджень встановлено достовірне зниження активності ендотеліальної форми та зростання індуцибельної форми NOS в ЛПК хворих на АС у порівнянні з практично здоровими донорами. Спостерігається відновлення ендотеліальної і зниження індуцибельної форми ензиму після лікування, що може свідчити про незначне відновлення функціональної активності лімфоцитів до нормального фізіологічного стану.

На сьогоднішній час ведеться активний пошук селективних інгібіторів індуцибельної NO-синтази та індукторів конститутивної NO-синтази, сполук, здатних пролонгувати ефект оксиду азоту и забезпечувати його транспорт до різних органів і тканин. Адекватна корекція гострих запальних процесів інгібіторами NO-синтази має принципове значення, оскільки NO може опосередковано впливати на розвиток ряду хронічних запальних та аутоімунних захворювань, зокрема, ревматичних. Подальше дослідження активності NO-синтази та ролі NO

в нормі та при патології приведе до поглиблення знань про патогенез ревматичних захворювань і появи нових критеріїв їх діагностики і лікування.

1. *Активність* аргінази в лімфоцитах периферичної крові у хворих на ревматоїдний артрит та анкілозивний спондилоартрит / Н.Е. Личковська, Р.В. Фафула, У.П. Єфремова [та ін.] // Світ біології та медицини. – 2011. – № 2. – С. 125–129.
2. *Активність* NO-синтази та вміст стабільних метаболітів оксиду азоту у лейкоцитах периферичної кровф щурів при введенні L-аргініну за умов хронічного рентгенівського опромінення / Л. Дацюк, Ю. Перетятко, У. Старанко [та ін.] // Вісник Львівського університету. – 2009. – № 51. – С. 37–42.
3. *Болдырев А.А.* Введение в биомембранологию / А.А. Болдырев. – М.: Изд.-во МГУ, 1990. – 208 с.
4. *Воробець Д.З.* Аналіз змін активності аргінази та NO-синтази в лімфоцитах периферичної крові при порушенні сексуальної функції у чоловіків / Д.З. Воробець, О.В. Коноварт // Практ. медицина: наук.-практ. журн. – 2010. – Т. 16, № 6. – С. 44–49.
5. *Вплив* L-аргініну на функціональну активність ендотелію за умов експериментального цукрового діабету / В. Сагач, О. Присяжна, М. Ткаченко [та ін.] // Фізіол. журн. – 2005. – Т. 51, № 2. – С. 3–7.
6. *Горен А.К.Ф.* Универсальная и комплексная энзимология синтазы оксида азота / А.К.Ф. Горен, Б. Манер // Биохимия. – 1998. – Т.63, № 7. – С. 870–880.
7. *Ензиматична* активність Ca^{2+}-транспортувальної, Mg^{2+}-залежної АТФази лімфоцитів периферичної крові у хворих на ревматоїдний артрит / Р.В. Фафула, Н.Е. Личковська, У.П. Єфремова [та ін.] // Мед. хімія. – 2011. – Т. 13, № 4(49). – С. 69–72.
8. *Кімакович О.В.* Дія квамателу та пірензепіну на активність транспортних АТФ-аз лімфоцитів периферійної крові / О.В. Кімакович, Н.О. Підковка, З.Д. Воробець // Практична медицина. – 2004. – Т. 10, № 2. – С. 86–89.
9. *Костогрыз В.Б.* Особенности метаболизма оксида азота у пациентов с хронической сердечной недостаточностью ишемической этиологии с имплантированным электрокардиостимулятором: возможности медикаментозной коррекции блокаторами бета-адренорецепторов / В.Б. Костогрыз, Т.В. Туровская // Укр. мед. часопис. – 2010. – № 5(79). – С. 81–84.
10. *Кочешкова Н.С.* Еозин-чутлива АТРазна активність у сперматозоїдах чоловіків як біохімічний тест на олігозооспермію / Н.С. Кочешкова, З.Д. Воробець // Укр. біохім. журн. – 2007. – Т. 79, № 2. – С. 45–55.
11. *Манухина Е.Б.* Оксид азота в сердечно-сосудистой системе: роль в адаптационной защите / Е.Б. Манухина, И.Ю. Малышев, Ю.В. Архипенко // Вестн. РАМН. – 2000. – № 4. – С.16–21.
12. *Манухина Е.Б.* Роль окиси азота в сердечно-сосудистой патологии: взгляд патофизиолога / Е.Б. Манухина, И.Ю. Малышев // Рос. кардиол. ж. – 2000. – № 5. – С. 55–63.
13. *Перетятко Ю.В.* Особливості аргіназного та NO-синтазного шляхів метаболізму L-аргініну в лейкоцитах периферичної крові щурів за хронічного рентгенівського опромінення / Ю.В. Перетятко, Н.О. Сибірна // Укр. біохім. журн. – 2009. – Т. 81, № 2. – С. 40–48.
14. *Підковка Н.О.* Дослідження деяких властивостей АТФаз у лімфоцитах крові людини / Н.О. Підковка, З.Д. Воробець, А.Б. Зіменковський // Експерим. та клін. фізіологія та біохімія. – 2002. – Т. 7, № 1. – С. 38–41.
15. *Смирнов В.В.* Рольоксида азота в физиологии и патологии органов и систем / В.В. Смирнов, Г.Е. Горбунов // Педиатрия. – 2010. – Т.89, № 6. – С. S182–S188.
16. *Шуба Н.М.* Невідкладні стани у пацієнтів із ревматичними хворобами: сучасні підходи до лікування / Н.М. Шуба // Укр. ревмат. журн. – 2008. – № 3. – С. 41–48.
17. *Boyum A.* Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood / A. Boyum // Scand. J. Clin. Lab. Invest. – 1968. – V. 21, N 97. – P. 77–79.
18. *Förstermann U.* Endothelial Nitric Oxide Synthase in Vascular Disease / U. Förstermann,T. Münzel // Circulation. – 2006. – V.113. – P. 1708–1714.
19. *Ignarro L.J.* Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview / L.J. Ignarro // J. Physiol. Pharmacol. – 2002. – V.53. – P. 503–514.
20. *Mishell B.B.* Selected Methods in Cellular Immunology / B.B. Mishell, S.M. Shiigi, W.H. Freeman [et al.]. – San Francisko: W.H. Freeman and Company, 1980. – 486 p.
21. *Michel T.* Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? / T. Michel, O.J. Feron // Clin. Invest. – 1997. – V.100. – P. 2146–2152.
22. *Protein* measurement with the Folin phenolreagent / O.H. Lowry, N.L. Rosebrough, A.L. Farr [et al.] // J. Biol. Chem. – 1951. – V. 193. – P. 265–275.
23. *Role* of arginine metabolism in immunity and immunopathology / E. Peranzoni, I. Marigo, L. Dolcetti [et al.] // Immunobiology. – 2007. – V. 212, N 9–10. – P. 795–812.

У.П. Ефремова, Н.Е. Личковская, Р.В. Фафула, З.Д. Воробец
Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого, Украина

ОСОБЕННОСТИ НИТРООКСИДСИНТАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ АНКИЛОЗИРУЮЩЕМ СПОНДИЛОАРТРИТЕ

В статье приведены результаты исследований по изучению энзиматической активности нитрооксидсинтазы лимфоцитов периферической крови у доноров и больных анкилозирующим спондилоартритом. Показано, что при развитии ревматической патологии активность эндотелиальной формы энзима снижается, а индуцибельной - резко возрастает по сравнению с практически здоровыми донорами. После проведенного лечения больных в стационаре наблюдается приближение NO-синтазной активности к ее контрольным значениям.

Ключевые слова: NO-синтаза, оксид азота, ревматические заболевания, анкилозирующий спондилоартрит, лимфоциты

U.P. Efremova, N.E. Lychkovska, R.V. Fafula, Z.D. Vorobets
Lviv National Medical University, Ukraine

THE PECULIARITIES OF NO-SYNTHASE ACTIVITY IN PERIFERAL BLOOD LYMPHOCYTES OF PATIENTS WITH ANKYLOSING SPONDYLITIS

The results of researches concerning enzymatic activity of NO synthase in peripheral blood lymphocytes in donors and patients with ankylosing spondylitis are presented in article. It was shown that under conditions of rheumatic pathology the activity of NOS endothelial form decreases and NOS inducible form drastically increases in comparison with practically healthy donors. After the patients treatment in the hospital the activity of NO synthase activity approaches to its control values.

Key words: NO-synthase, nitric oxide, rheumatic disease, ankylosing spondylitis, lymphocytes

Рекомендує до друку
О.Б. Столяр

Надійшла 25.04.2012

УДК 546.76:678.048

Р.Я. ІСКРА, В.В. ВЛІЗЛО
Інститут біології тварин НААН України
вул. Василя Стуса, 38, Львів, 79034

СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗНА, КАТАЛАЗНА ТА NO-СИНТАЗНА АКТИВНІСТЬ У ТКАНИНАХ ЩУРІВ ЗА ВПЛИВУ ЦИТРАТУ ХРОМУ

Досліджували вплив цитрату хрому в дозі 10 мкг Cr^{3+}/кг маси тіла щурів на вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів, активність ензимів антиоксидантної системи та NO-синтаз у тканинах. Виявлено, що за дії сполуки хрому активність супероксиддисмутази, на противагу вмісту ТБК-активних продуктів перекисного окиснення ліпідів, зменшувалась у мозку і селезінці та збільшувалась в легенях, серцевому і скелетному м'язах. Активність каталази зростала у всіх тканинах тварин дослідної групи. За дії цитрату хрому зростала активність NO-синтаз у тканинах щурів, що обумовлено, в основному, активацією конститутивної NO-синтази. Загалом, сполука хрому проявляла здатність посилювати прооксидантні процеси на початкових етапах своєї дії, що в подальшому супроводжувалося збільшенням активності ензимів антиоксидантного захисту та NO–синтаз та, відповідно, і зниженням рівня продуктів ПОЛ.

Ключові слова: щур, оксид нітрогену, конститутивна NO-синтаза, індуцибельна NO-синтаза, антиоксидантна система