

УДК 616.248-092.4/9-092:612.015.113

Колішецька М. А., Регада М. С.

РОЛЬ ПОРУШЕНЬ МЕТАБОЛІЗМУ ОКСИДУ АЗОТУ ДЛЯ ПАТОГЕНЕЗУ РОЗВИТКУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ БРОНХІАЛЬНОЇ АСТМИ

Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького

marta.kolishetska@gmail.com

У експерименті на морських свинках показано, що бронхіальна астма (БА) супроводжується істотною зміною активності аргіназо-NO-синтазної системи лімфоцитів крові (підвищення аргіназної активності лімфоцитів та зростання активності індукцибельної NO-синтази супроводжується компенсаторним інгібуванням активності ендотеліальної ізоформи NOS). Інтенсивність аргіназної активності та індукцибельної NO-синтази поступово зростають прямо пропорційно ступеню ураження і досягають максимуму в пізній період експерименту (на 33-тю добу БА). Паралельно фіксуємо зниження активності ендотеліальної NOS.

Ключові слова: бронхіальна астма; оксид азоту; лімфоцити; аргіназа; NO-синтази.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дане дослідження є фрагментом планової наукової роботи кафедри патологічної фізіології Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького «Патогенетичні аспекти формування алергічних і запальних процесів, вплив їх на реактивність організму та фармакокорекція», № державної реєстрації 01104000126.

Вступ. Серед значущих проблем світової охорони здоров'я чільне місце займає бронхіальна астма (БА), яка залишається в центрі уваги педіатрів, алергологів, терапевтів, що пов'язано з високою питомою вагою цієї патології у структурі алергічних захворювань, зростанням і розповсюдженням тяжких та ускладнених форм захворювання, особливо в дитячому віці [3]. Сьогодні БА асоційована з ризиком інвалідизації та смертності. Згідно з даними ВООЗ, серед 15 мільйонів пацієнтів, що є інвалідами, 1 % становлять хворі на бронхіальну астму. Ця патологія не тільки впливає на психічні, фізичні та соціальні аспекти життя хворої дитини, але й морально і фінансово виснажує членів її сім'ї. Саме тому своєчасне виявлення БА сприятиме не лише зниженню інвалідизації і підвищенню ефективності лікування, але й уникненню додаткових фінансових витрат сім'ї [1,4].

БА – це самостійне хронічне захворювання, обов'язковим патогенетичним механізмом якого є

хронічний запальний процес і пов'язана з ним гіперреактивність бронхів, зумовлені специфічними імунологічними (сенсibiliзація та алергія) чи неспецифічними механізмами [5, 12]. Дана патологія розвивається на підставі поліморфізму імунорегляторних генів, які регулюють синтез IgE-антитіл та еозинофільне запалення і водночас під впливом факторів зовнішнього середовища. Власне, взаємодія цих чинників ризику веде до формування БА.

Останніми роками в процесі вивчення патогенезу бронхіальної астми велика увага приділяється значенню оксиду азоту (NO), який вважається сигнальною молекулою міжклітинної взаємодії. Молекула NO є простим радикалом, що легко утворює ковалентні зв'язки, оскільки містить неспарений електрон [11, 12]. У природних умовах NO живе всього декілька секунд, після чого перетворюється на нітрит. Оксид азоту здатний без зусиль проникати крізь клітинні мембрани завдяки відсутності заряду і украй малій величині молекули. NO бере участь у багатьох фізіологічних процесах. У легенях, за даними імуногістохімічних досліджень, є присутніми усі три ізоформи синтази оксиду азоту [6]. Ендотеліальна NO-синтаза (eNOS) є присутня в ендотелії судин бронхів і епітеліальних клітинах, нейрональна NO-синтаза – в холінергічних і нехолінергічних/неадренергічних нервах бронхів і також в епітеліальних клітинах. Макрофагальна NO-синтаза визначається у багатьох типах клітин у відповідь на цитокіни, ендотоксин і оксиданти. При астмі вона локалізована переважно в епітеліальних клітинах, макрофагах і еозинофілах. І конститутивна, і індукцибельна NO-синтази (iNOS) відіграють роль в продукції NO в ранній фазі запалення, тим самим проявляючи свій прозапальний ефект [9]. В той же час NO-синтази контролюють біосинтез інтерлейкінів ІЛ-4, ІЛ-11, ІЛ-13, що відносяться до інгібіторів запальної реакції [8]. Оксид азоту пригнічує активність Th1-клітин і, таким чином, сприяє розвитку Th2-відповіді, є потужним активатором хемотаксиса еозинофілів і нейтрофілів та пригнічує апоптоз цих важливих ефекторів atopічного запалення. Продукований під впливом iNOS азоту оксид взаємодіє з продуктом часткового відновлення кисню,

що накопичився у вогнищі запалення, – супероксидом. У результаті такої взаємодії утворюється медіатор пероксинітрит, який викликає ушкодження клітин, білків, ліпідів клітинних мембран, ушкоджує судинний епітелій, підвищує агрегацію тромбоцитів, стимулює запальний процес у бронхопульмональній системі [7,8]. Таким чином, NO-синтази і продукований ними оксид азоту являються «справжніми» регуляторами запалення. Збільшення продукції NO, маючи важливе адаптивне значення для організму, може перетворюватись із ланки адаптації в патогенетичну і стати небезпечним пошкоджувальним фактором для організму [3, 8, 9].

Незважаючи на наукові розробки, які ведуться в цьому напрямку, вивчення ролі NO-залежних механізмів у розвитку БА дозволить краще зрозуміти основні патогенетичні закономірності розвитку даної патології, які значною мірою не з'ясовані.

Мета роботи – вивчити активність синтаз оксиду азоту (ендотеліальної та індубельної), аргіназну активність лімфоцитів периферійної крові морських свинок з експериментальною БА.

Матеріали і методи дослідження. Всі експерименти на лабораторних тваринах були проведені при дотриманні принципів біоетики у відповідності з положенням Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986), Директиви Ради Європи 2010/63/EU, Закону України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження», загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених першим національним конгресом України з біоетики (2001).

Експериментальні дослідження проводились на 72 морських свинках (самцях) масою 180–220 г, поділених на 5 груп по 15 тварин у кожній. До I групи (контроль) відносили інтактні морські свинки, до II – тварини з експериментальною БА (5-та доба), до III – морські свинки на 19-ту добу модельного процесу, до IV – тварини з експериментальною БА (26-та доба), до V – мурчаки на 33-тю добу експерименту. З метою більш детального аналізу досліджуваних нами показників умовно виділяли два періоди розвитку експериментальної бронхіальної астми: ранній і пізній. Ранній період включав групу тварин із БА на 5-ту та 19-ту доби експерименту. Пізній – морські свинки на 26-ту та 33-тю доби БА.

Експериментальна модель БА відтворювалась на морських свинках за методом В. І. Бабича (1979). Попередньо тварин одноразово сенсibiliзували нормальною кінською сироваткою (0,1 мл внутрішньочеревинно). Наступні три дні підряд вводили підшкірно 0,1 мл нормальної кінської сиро-

ватки (НКС) з вбитою в автоклаві БЦЖ (на 1 мг БЦЖ 1,0 мл НКС). Наступні 14 днів щоденно тварини протягом 30 хв. в щільно закритій камері за допомогою розпилювача піддавалися інгаляції НКС по 1,0 мл сироватки на кожну морську свинку. Після закінчення цього терміну кожні 7 днів морським свинкам проводили інгаляції НКС. Потім тварин декапітували під впливом ефірного наркозу та визначали активність NO синтаз за специфічним розщепленням NADPH(H+), аргіназну активність лімфоцитів за утворенням сечовини [2]. Варіаційно-статистичне опрацювання даних здійснювали з використанням програмного пакета для персональних комп'ютерів *Microsoft Excel*. Достовірність змін змін встановлювали за *t*-критерієм Стьюдента.

Результати дослідження та їх обговорення.

У динаміці формування БА встановлено, що аргіназна активність лімфоцитів крові практично лінійно зростає вже у ранньому періоді і досягає максимуму в найпізніший термін експерименту. Так на 5-ту добу формування БА досліджуваний показник підвищується на 8,8% ($p \leq 0,05$) в порівнянні з I групою тварин, а на 19-у добу активність аргінази вже значно прогресує відносно групи контролю (збільшення на 46,8% ($p \leq 0,05$)). У пізній період розвитку БА, активність аргінази продовжує зростати, а саме на 65% ($p \leq 0,05$) і 87,8% ($p \leq 0,05$) відповідно на 26-у і 33-ю доби модельного процесу при порівнянні з інтактними тваринами (**табл.**). Зростання аргіназної активності лімфоцитів свідчить про зміни функціональної активності в лімфоцитах крові, зокрема про активацію неокисного шляху метаболізму L-аргініну [10].

При оцінці активності eNOS зафіксовано її спадання в динаміці формування експериментальної БА. Так, рівень eNOS на початковому етапі розвитку модельного процесу, зокрема на 5-ту добу, був знижений на 12,4% ($p \leq 0,05$) у порівнянні з контрольними величинами. Пізніше, на 19-ту добу експерименту відмічалась поступова регресія досліджуваного показника на 23,9 % ($p \leq 0,05$) проти першої групи тварин і на 32,2 % ($p \leq 0,05$) на 26-ту добу експериментальної моделі проти першої групи тварин. У найпізніший термін на 33-тю добу активність eNOS істотно відрізнялася від контрольної групи і становила ($39,21 \pm 3,2$) нмоль сечовини/хв на 1 мг протеїну, що на 44,1% ($p \leq 0,05$) нижче в порівнянні з інтактними тваринами (**табл.**).

Вивчаючи активність iNOS у лімфоцитах периферійної крові морських свинок при експериментальній БА, спостерігали наступну картину: iNOS на 5 добу підвищувалась на 22,4% ($p \leq 0,05$) при порівнянні з контрольними величинами. Далі, на 19 добу модельного процесу було виявлено, що даний показник вже зріс на 40,7% ($p \leq 0,05$) відносно

I групи тварин, а в подальшому, на 26-ту і 33-тю доби експерименту, встановлено ще інтенсивнішу його прогресію відповідно на 56,5% ($p \leq 0,05$) і 93 % ($p \leq 0,05$) проти групи контролю (табл.). Зростання активності індукцибельної NO-синтази лімфоцитів свідчить про зміни функціональної активності імункомпетентних клітин і порушення метаболічних процесів [6].

Висновки. У результаті проведених досліджень виявлено зміни активності аргіназо-NO-синтази системи лімфоцитів крові, а саме підвищення аргіназоної активності лімфоцитів та зростання активності індукцибельної NO-синтази супроводжується компенсаторним інгібуванням активності ендотеліальної ізоформи NOS. Значна активація

iNOS призводить до надлишкового утворення оксиду азоту в лімфоцитах крові, який, у свою чергу, у високих концентраціях ініціює процеси оксидативного та нітрозивного стресу, які ведуть до порушення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги. У результаті цього відбувається активація апоптичних механізмів та ініціація деструктивних процесів у клітинах, що веде до прогресування дисфункції.

Перспективи подальших досліджень. У подальшому планується дослідження впливу фармакологічної корекції на активність синтази оксиду азоту (ендотеліальної та індукцибельної), аргіназну активність лімфоцитів периферійної крові морських свинок за умов розвитку експериментальної бронхіальної астми.

Активність аргінази, NO-синтаз у лімфоцитах периферійної крові у мурчаків при експериментальній БА (M ± m, n=75)

Форма досліджу	Тривалість захворювання в добах	Кількість тварин	Активність аргінази, нмоль сечовини/хв на 1 мг протеїну	eNOS, нмоль NADPH(H+)/хв на 1 мг протеїну	iNOS, нмоль NADPH(H+)/хв на 1 мг протеїну
Інтактні тварини. Контроль		15	84,1±4,5*	70,2±6,0*	70,6±6,0*
Морські свинки з експериментальною БА	5	15	91,5±1,9*	61,5±3,4*	86,4±2,4*
	19	15	123,5±3,0*	53,5±2,4*	99,3±3,2*
	26	15	138,8±3,2*	47,6±2,5*	110,5±3,4*
	33	15	157,9±1,7*	39,2±3,2*	136,3±2,3*

Примітка: * – зміни вірогідні щодо величин групи контролю ($p \leq 0,05$).

Література

1. Бронхіальна астма, поєднана з алергічним ринітом, у дітей: місце антигістамінних препаратів у лікуванні / [Ю. Г. Антіпкін, Т. Р. Уманець, В. Ф. Лапшин та ін.] // Астма та алергія. – 2014. – № 4. – С. 60–65.
2. Дацюк Л. Активність NO-синтази та вміст стабільних метаболітів оксиду азоту в лейкоцитах периферійної крові щурів при введенні L-аргініну за умов хронічного рентгенівського опромінення / Л. Дацюк, Ю. Перетятко // Вісник Львівського університету. – 2009. – Вип. 51. – С. 37–42.
3. Регада М. С. Бронхіальна астма. Вид. п'яте, доп. та переробл. / М. С. Регада, М. М. Регада, Л. О. Фурдичко, М. А. Колішецька. – Львів, 2012. – 147 с.
4. Речкина Е. А. Распространенность бронхиальной астмы у детей и ее гиподиагностика / Е. А. Речкина // Перинатология та педіатрія. – 2012. – № 4 (52). – С. 80–84.
5. Романюк Л. И. Аллергический ринит как коморбидное состояние бронхиальной астмы / Л. И. Романюк // Астма та алергія. – 2013. – № 2. – С. 62–65.
6. Севостьянова И. В. Влияние полиморфизма гена эндотелиальной синтазы оксида азота на состояние сосудистого эндотелия у больных бронхиальной астмой / И. В. Севостьянова [и др.] // Астраханский медицинский журнал. – 2013. – Т. 8, № 3. – С. 83–85.
7. Beta-2 Adrenergic Receptor (ADRB2) Gene Polymorphisms and the Risk of Asthma: A Meta-Analysis of Case-Control Studies / S. Liang, C. Akdis, M. Jutel [et al.] // PLoS ONE. – 2014. – Vol. 9, № 8. – P. e104488.
8. Khaki-Khatibi F. Association between T-786C polymorphism of endothelial nitric oxide synthase gene and level of the vessel dilation factor in patients with coronary artery disease / F. Khaki-Khatibi // Molecular Biology Research Communications. – 2012. – Vol. 1. – P. 1–7.
9. Hasanzad M. Генетический полиморфизм эндотелиальной синтазы оксида азота при ишемической болезни сердца / M. Hasanzad // Международный журнал сердца и сосудистых заболеваний. – 2014. – Т. 2, № 2. – С. 32–36.
10. Nitric oxide synthase polymorphisms, gene expression and lung function in chronic obstructive pulmonary disease / [F. Aminuddin, A.-C. Enelund, B. Eriksson et al.] // BMC Pulmonary Medicine. – 2013. – Vol. 13. – P. 64.
11. The Heterogeneity of Asthma Phenotypes in Children and Young Adults / [B. Hesselmar, A.-C. Enelund, B. Eriksson et al.] // Journal of Allergy. – 2012. – P. 1–6.
12. Untangling asthma phenotypes and endotypes / [I. Aganche, C. Akdis, M. Jutel et al.] // Allergy. – 2012. – Vol. 67, Iss. 7. – P. 835–846.

References

1. Antipkin YH, Umanets TR, Lapshyn VF, et al. Asthma linked to allergic rhinitis in children: a place in the treatment of antihistamines. *Asthma and allergy*. 2014;4:60–5. (in Ukrainian)
2. Datsyuk L, Peretyatko Y. Activity of NO-synthase and the content of stable nitric oxide metabolites in peripheral blood leukocytes of rats when administered L-arginine under conditions of chronic exposure. *Bulletin of Lviv University*. 2009;51:37–42. (in Ukrainian)
3. Regeda MS, Furdychko LO, Kolishetska MA. *Bronchial Asthma*. Lviv; 2012. 147p. (in Ukrainian)
4. Rechkyina EA. Prevalence of bronchial asthma in children and it's hypodiagnostic. *Pediatrics and perinatology*. 2012; 4(52):80–4. (in Ukrainian)
5. Romaniuk LI. Allergic rhinitis as comorbid status of bronchial asthma. *Asthma and allergy*. 2013;2:62–5. (in Ukrainian)
6. Sevostyanova IV, et al. Effect of gene polymorphism of endothelial nitric oxide synthase in vascular status of endothelium in patients with bronchial asthma. *Astrahanskyi medical journal*. 2013;8(3):83–5. (in Russian)
7. Liang S, Akdis C, Jutel M, et al. Beta-2 Adrenergic Receptor (ADRB2) Gene Polymorphisms and the Risk of Asthma: A Meta-Analysis of Case-Control Studies. *PLoS ONE*. 2014;9(8):e104488.
8. Khaki-Khatibi F. Association between T-786C polymorphism of endothelial nitric oxide synthase gene and level of the vessel dilation factor in patients with coronary artery disease. *Molecular Biology Research Communications*. 2012;1:1–7.
9. Hasanzad M. Geneticheskiy polimorfizm endotelial'noy sintazy oksida azota pri ishemicheskoy bolezni serdtsa. *Mezhdunarodnyy zhurnal serdtsa i sosudistykh zabolovaniy*. 2014;2(2):32–6. (in Russian)
10. Aminuddin F, Enelund A.-C, Eriksson B., et al. Nitric oxide synthase polymorphisms, gene expression and lung function in chronic obstructive pulmonary disease. *BMC Pulmonary Medicine*. 2013;13:64.
11. Hesselmar B, Enelund A.-C, Eriksson B, et al. The Heterogeneity of Asthma Phenotypes in Children and Young Adults. *Journal of Allergy*. 2012:1–6.
12. Aganche I, Akdis C, Jutel M, et al. Untangling asthma phenotypes and endotypes. *Allergy*. 2012;67(7):835–46.

УДК 616.248-092.4/9-092:612.015.113

**РОЛЬ НАРУШЕНИЙ МЕТАБОЛИЗМА ОКСИДА АЗОТА ДЛЯ ПАТОГЕНЕЗА
РАЗВИТИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ**

Колишецкая М. А., Регада М. С.

Резюме. В эксперименте на морских свинках показано, что бронхиальная астма (БА) сопровождается существенным изменением активности аргиназы-NO-синтазного системы лимфоцитов крови (повышение аргиназной активности лимфоцитов и возрастание индуцибельной NO-синтазы сопровождается компенсаторным ингибированием активности эндотелиальной изоформы NOS). Интенсивность аргиназной активности и индуцибельной NO-синтазы постепенно растут прямо пропорционально степени поражения и достигают максимума в поздний период эксперимента (на 33-е сутки БА). Параллельно фиксируется снижение активности эндотелиальной NOS.

Ключевые слова: бронхиальная астма; оксид азота; лимфоциты; аргиназа; NO-синтазы.

UDC 616.248-092.4/9-092:612.015.113

**THE ROLE OF DISORDERS OF METABOLISM OF NITRIC OXIDE FOR PATHOGENESIS
OF EXPERIMENTAL BRONCHIAL ASTHMA**

Kolishetska M. A., Regeda M. S.

Abstract. The aim is to study the activity of nitric oxide synthase (endothelial and inducible), arginase activity of peripheral blood lymphocytes of Guinea pigs with experimental asthma.

Materials and methods. All experiments on laboratory animals carried out with following the European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (Strasbourg, 1986), Council Directive 2010/63 / EU, the Law of Ukraine 3447 – IV «protection animals from the cruelty» the general ethics of animal experimentation adopted by the first national Congress on bioethics in Ukraine (2001). The researches were carried out on 72 Guinea-pigs (category: *Cavia porcellus*, males). The weight of each one was 180–220 g. They were divided into 5 groups for 15 animals in each of them. Among the first group (control) there were intact Guinea-pigs. Among the second group there were animals with an experimental BA (on 5th day of experiment). Among the third group there were Guinea-pigs on the 19th day of the experiment. The fourth group consisted of animals with an experimental BA (on 26th day of the experiment) and the fifth group included Guinea-pigs with an experimental BA (33rd day). Two periods of experimental asthma were separated in order to make detailed analysis and interpretation of indicators of endogenous intoxication in different days of the experiment: early period and late one. The early period included a group of animals with BA on the 5th and 19th days of the experiment. Late period included Guinea pigs on 26th and 33rd day of asthma.

The experimental asthma model reproduced in Guinea pigs by Babich method (1979). Animals were sensitized by a normal horse serum (0.1 ml intraperitoneally). Next three days they were entered subcutaneously 0.1 ml of normal horse serum (NKS) with a setting in an autoclave BCG (1 mg BCG 1.0 ml NKS). The next 14 days the animals were exposed to inhalation (using a spray) NKS to 1.0 ml of serum for each Guinea pig daily for 30 minutes in a sealed chamber. After this period every 7 days, Guinea pigs had these NKS inhalation. Then the animals were decapitated under the influence of ether anesthesia. In all groups of Guinea pigs there were determined NO synthase activity by specific cleavage NADPH (H⁺), arginase lymphocyte activity by the formation of urea. Numerical results were adapted with static method using Student's criteria.

Results of the research. The dynamics of formation of asthma found that arginase activity of blood lymphocytes increases almost linearly at an early period and reaches a maximum term experiment at the latest. Since the 5-day study of BA formation rate increased by 8.8% ($r \leq 0,05$) and after 19 days the activity of arginase is much progress relative to the control group (an increase of 46.8% ($r \leq 0,05$)). In the later period of asthma continues increasing arginase activity, namely 65% ($r \leq 0,05$) and 87.8% ($r \leq 0,05$) respectively 26th and 33rd day modeling process when compared with intact animals.

To assess the activity of endothelial NO-synthase (eNOS) it was recorded its reduction in the dynamics of the formation of experimental asthma. Thus, the level of eNOS on the 5th day was reduced by 12.4% ($r \leq 0,05$) compared with control values. Later, on the 19th day of the experiment it was observed gradual regression of the studied index by 23.9% ($r \leq 0,05$) compared with the first group of animals and 32.2% ($r \leq 0,05$) on the 26th day experimental model against the first group of animals. In the latest period on the 33rd day eNOS activity by 44.1% ($r \leq 0,05$) was lower compared to intact animals.

Studying inducible No-synthase (iNOS) activity in peripheral blood lymphocytes of Guinea pigs in experimental asthma the following picture was observed: on 5th day iNOS was increased by 22.4% ($p \leq 0,05$) compared with control values. Next, a 19 day process model was found and this figure has increased by 40.7% ($p \leq 0,05$) the relative of groups of animals, and later, on the 26th and 33rd day of the experiment, it was found that it was even harder progression respectively 56.5% ($p \leq 0,05$) and 93% ($r \leq 0,05$) compared with the control group.

Conclusions. As a result of studies there were changes in the activity of arginase-NO-synthase system of blood lymphocytes, which improve arhinase activity of lymphocytes and increased activity of inducible NO-synthase and they were accompanied by compensatory inhibition activity of endothelial isoforms of NOS.

Keywords: bronchial asthma; nitric oxide; lymphocytes; arginase; NO-synthases.

Стаття надійшла 07.04.2017 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування