

DOI: 10.26693/jmbs02.06.026

УДК 616.248-092.9:[616.153.94:615.274]

Колішецька М. А.

ВПЛИВ ТІОТРИАЗОЛІНУ НА ПОКАЗНИКИ СИСТЕМИ ОКСИДУ АЗОТА ЗА УМОВ ФОРМУВАННЯ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ БРОНХІАЛЬНОЇ АСТМИ

Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького

marta.kolishetska@gmail.com

У результаті проведених досліджень встановлено, що за умови розвитку експериментальної бронхіальної астми спостерігається стимуляція аргіназної активності лімфоцитів, зростання активності індукцибельної NO-синтази та, водночас, пригнічення активності ендотеліальної ізоформи NOS в крові, причому ці показники були найбільше виражені на пізніх етапах її формування (33-я доба). Використання тіотриазоліну з лікувальною метою зумовило зниження аргіназної активності лімфоцитів на 32,5% ($p \leq 0,05$), значного підвищення вмісту eNOS у крові на 51,1% ($p \leq 0,05$) та зниження iNOS на 32,1% ($p \leq 0,05$) в порівнянні з групою тварин, які не піддавалися впливу цього препарату. Отже, як показують отримані дані, застосування тіотриазоліну показало його коригуючий вплив на змінні показники метаболізму оксиду азота в периферійній крові морських свинок за умов розвитку експериментальної бронхіальної астми.

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

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 фармакорекція», № державної реєстрації 01104000126.

Вступ. Актуальність проблеми бронхіальної астми (БА) для системи охорони здоров'я і суспільства загалом визначається поширеністю, значною часткою інвалідизації, певним рівнем смертності дітей з цією патологією [6]. Складність діагностики пояснюється відсутністю монопредикторів розвитку, багатофакторністю механізмів, що сприяють формуванню та прогресуванню БА у дітей, особливостями перебігу захворювання [1]. Водночас недостатня підготовка лікарів першого контакту (поліклінічної служби) у питаннях клінічної алергології призводить до пізньої діагностики БА і несвое-

часного призначення адекватної терапії [7]. Значна поширеність і наявність стійкої тенденції до підвищення захворюваності на бронхіальну астму визначають актуальність і пріоритетність наукових досліджень у напрямі вдосконалення діагностичних і лікувальних заходів у цього контингенту хворих [5].

На сучасному етапі БА розглядається як захворювання, в основі якого лежать імунні порушення [14]. Відомо, що лімфоцити крові – це ключові клітини імунної системи, що відіграють провідну роль у забезпеченні компенсаторно-приспосувальних реакцій організму. Оскільки внутрішньоклітинний метаболізм лімфоцитів ґрунтується на фізіологічно і біохімічно закріпленій здатності цих клітин швидко реагувати на будь-які зміни гомеостазу в організмі, то модуляція активності ферментів у лімфоцитах настає значно раніше, ніж змінюються їх морфологічні показники [8,11]. Згідно із сучасними дослідженнями, оксид азоту (NO) розглядається як важливий фізіологічний регулятор функцій та метаболічних процесів у клітинах. У механізмі утворення NO основну роль відіграє амінокислота L-аргінін у присутності оксидазотних синтетаз NOS. Система NO/NOS здатна впливати на активність головних систем організму [10,12]. З'ясування цих питань сприятиме визначенню нових ланок патогенезу бронхіальної астми, покращенню якості ранньої діагностики патологічного процесу, розробленню критеріїв, що дозволятимуть прогнозувати перебіг хвороби та ефективність фармакотерапії.

Незважаючи на значний прогрес у розумінні механізмів розвитку БА, впровадження у практику уніфікованих підходів до терапії, відсутня тенденція як до зниження захворюваності, так і до зменшення частоти тяжкого перебігу хвороби [9,13]. Тому пошуки найбільш ефективних шляхів лікування, що дозволяють домогтися не тільки контролю над захворюванням, але й зменшити число ускладнень, є важливим завданням сучасної медицини [2]. Вивчення ефективності застосування комплексу засобів, які б одночасно відновлювали пошкоджені

мембрани клітин, мали антиоксидантний ефект, коригували розлади системи оксиду азоту, імунної системи є перспективним. У цьому плані нашу увагу привертає вітчизняний препарат тіотриазолін, що має імунокоригуючі, мембраностабілізуючі та антиоксидантні властивості [3].

Мета роботи – вивчити зміни ензиматичної активності NO-синтаз та аргінази лімфоцитів крові в морських свинок з експериментальною бронхіальною астмою до і після лікування тіотриазоліном.

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 180 морських свинках (самцях) масою 180–220 г, поділених на 6 груп по 30 тварин у кожній. До I групи (контроль) відносили інтактні морські свинки, до II – тварини з експериментальною БА (5-а доба), до III – морські свинки на 19-у добу модельного процесу, до IV – тварини з експериментальною БА (26-а доба), до V – мурчаки на 33-ю добу експерименту (до лікування тіотриазоліном) і до VI – тварини з модельним процесом БА після застосування тіотриазоліну. Для корекції порушень VI групі тварин вводився препарат тіотриазолін з розрахунку 100 мг/кг внутрішньом'язово з 23 доби експерименту впродовж 10 днів. 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-у та 19-у доби експерименту. Пізній – морські свинки на 26-у та 33-ю доби БА.

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

значали активність NO синтаз за специфічним розщепленням NADPH(H+), аргіназну активність лімфоцитів за утворенням сечовини [4]. Варіаційно-статистичне опрацювання даних здійснювали з використанням програмного пакета для персональних комп'ютерів *Microsoft Excel*. Достовірність змін встановлювали за *t*-критерієм Стьюдента.

Результати дослідження та їх обговорення. При вивченні активності синтаз оксиду азоту (ендотеліальної та індукцибельної), аргіназної активності лімфоцитів периферійної крові морських свинок з експериментальною БА було встановлено, що на усіх етапах її формування мали місце вірогідні зміни показників у порівнянні з групою контролю. Цікавим підтвердженням одержаних результатів служить порівняльна характеристика величин показників системи NO в крові між групами тварин з бронхіальною астмою в різні доби дослідження. Встановлено поступове зростання аргіназної активності лімфоцитів в залежності від тривалості патологічного процесу: на 19-у, 26-у і 33-ю доби цей показник підвищується відповідно на 35% ($p \leq 0,05$), 51,7% ($p \leq 0,05$) і 72,6% ($p \leq 0,05$) відносно групи мурчаків на 5-у добу експерименту. Використання тіотриазоліну з лікувальною метою зумовило зниження аргіназної активності лімфоцитів на 32,5% ($p \leq 0,05$) проти групи морських свинок з БА до лікування (рис.1).

У разі проведення порівняння показників активності eNOS з різними групами тварин на БА виявлено, що зміни в її динаміці мають зворотній характер. Достовірною є зниження даної синтази оксиду азоту в усі досліджувані доби в порівнянні з II групою тварин: на 13% ($p \leq 0,05$), 22,5% ($p \leq 0,05$) і 36,2% ($p \leq 0,05$) відповідно на 19-у, 26-у і 33-ю доби експериментальної БА.

Відносно наступної синтази оксиду азоту - індукцибельної, нами спостерігалось її зростання в периферійній крові тварин по мірі розвитку експериментальної БА. Підвищення даного маркера спостерігалось на 19-у добу на 15% ($p \leq 0,05$), на 26-у добу на 27,9% ($p \leq 0,05$) і на 33-ю добу на 57,7% ($p \leq 0,05$) на протилежній групі мурчаків, що говорить про пряму залежність часу антигенного впливу на рівень досліджуваних нами тестів.

Використання тіотриазоліну з розрахунку 100 мг/кг внутрішньом'язово з 23-ої доби експерименту впродовж 10 днів призвело до часткової корекції показників системи оксиду азоту, а саме досить значного підвищення вмісту eNOS у крові на 51,1% ($p \leq 0,05$) та зниження iNOS на 32,1% ($p \leq 0,05$) при БА в порівнянні з групою тварин, які не піддавалися впливу цього препарату, що свідчить про позитивний коригуючий вплив цього лікарського засобу на досліджувані тести (рис.).

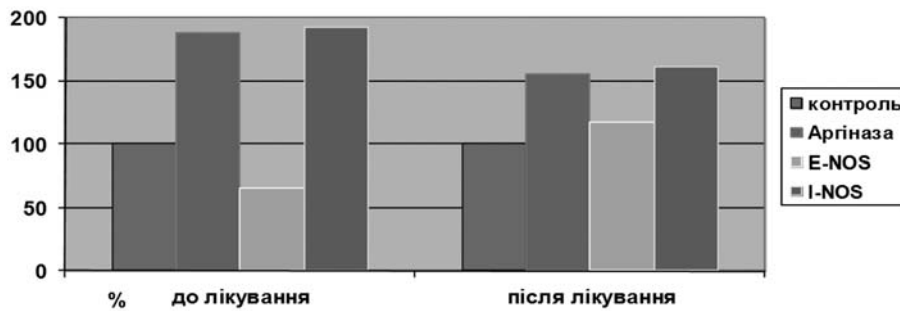


Рис. Вплив тіотриазоліну на рівень показників системи оксиду азота в крові морських свинок при БА

У результаті проведених досліджень встановлено динаміку змін активностей ензимів після проведеного лікування, а саме наближення величин активностей NO-синтаз, аргінази до контрольних значень.

Висновки. Отже, як показують отримані дані, за умови розвитку експериментальної бронхіальної астми спостерігається стимуляція аргіназної активності лімфоцитів, зростання активності індукційної NO-синтази та, водночас, пригнічення активності ендотеліальної ізоформи NOS в крові, причому ці показники були найбільше виражені на пізніх

етапах її формування (33-я доба). Застосування тіотриазоліну показало його коригуючий вплив на змінені показники метаболізму оксиду азота в периферійній крові морських свинок за умов розвитку експериментальної БА.

Перспективи подальших досліджень. У подальшому планується дослідження додаткових показників метаболізму оксиду азота периферичної крові морських свинок за умов розвитку експериментальної бронхіальної астми та їх фармакологічна корекція.

References

- Alifanova SV. Risk Factors Of Bronchial Asthma in Children. *Actual questions in pharmaceutical and medical science*. 2013; 3 (13), 4–7. [Ukrainian].
- 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. [Ukrainian].
- Opanasenko GV, Potter OO, Phrancuzova SB, Mankovska IN. Influence of the thiotriazoline on the state of pro- and antioxidant balance in soft fabrics of paradont at the terms of chronic stress. *Tavrisheskiy medico-biological vistnyk*. 2012; 15 (3), 246–9. [Ukrainian].
- 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. [Ukrainian].
- Regeda MS, Furdychko LO, Kolishetska MA. *Bronchial Asthma*. Lviv; 2012. 147 p. [Ukrainian].
- Rechkyha EA. Prevalence of bronchial asthma in children and it's hypodiagnostic. *Pediatrics and perinatology*. 2012; 4 (52): 80-4. (in Ukrainian).
- Romaniuk LI. Allergic rhinitis as comorbyd status of bronchial asthma. *Asthma and allergy*. 2013; 2: 62-5. [Ukrainian].
- 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. [Russian].
- Liang S, Chen XL, Deng JM, Wei X, Gong C, Chen ZR, Wang ZB. 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. PMID: 25111792. PMCID: PMC4128804. DOI: 10.1371/journal.pone.0104488.
- Khaki-Khatibi F, Yaghoubi AR, Ghojazadeh M, Rahbani-Nobar M. 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.
- Hasanzad M. Geneticheskyy polimorfizm endotelial'noy sintazy oksida azota pri ishemicheskoy bolezni serdtsa. *Mezhdunarodnyy zhurnal serdtsa i sosudistykh zabolevaniy*. 2014; 2 (2): 32-6. [Russian].
- Aminuddin F, Hackett T-L, Stefanowicz D, Saferali A, Paré PD, Gulsvik A, Bakke P, Cho MH, Litonjua A, et al. Nitric oxide synthase polymorphisms, gene expression and lung function in chronic obstructive pulmonary disease. *BMC Pulmonary Medicine*. 2013; 13: 64. <https://doi.org/10.1186/1471-2466-13-64>.
- 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.
- Aganche I, Akdis C, Jutel M, Virchow JC. Untangling asthma phenotypes and endotypes. *Allergy*. 2012; 67 (7): 835–46. PMID: 22594878. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2012.02832.x.

УДК 616.248-092.9:[616.153.94:615.274]

ВЛИЯНИЕ ТИОТРИАЗОЛИНА НА ПОКАЗАТЕЛИ СИСТЕМЫ ОКСИДА АЗОТА В УСЛОВИЯХ ФОРМИРОВАНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ*Колишецкая М. А.*

Резюме. В результате проведенных исследований установлено, что в условиях развития экспериментальной бронхиальной астмы наблюдается стимуляция аргиназной активности лимфоцитов, возрастание индуцибельной NO-синтазы и, в то же время, ингибирование активности эндотелиальной изоформы NOS в крови, причем эти показатели были больше всего выражены на поздних этапах ее формирования (33-я сутки). Использование тиотриазолина в лечебных целях обусловило снижение аргиназной активности лимфоцитов на 32,5% ($p \leq 0,05$), значительного повышения содержания eNOS в крови на 51,1% ($p \leq 0,05$) и снижение iNOS на 32,1% ($p \leq 0,05$) по сравнению с группой животных, которые не поддавались влиянию этого препарата. Следовательно, как показывают полученные данные, применение тиотриазолина показало его корректирующее влияние на измененные показатели метаболизма оксида азота в периферийной крови морских свинок при условиях развития экспериментальной бронхиальной астмы.

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

UDC 616.248-092.9:[616.153.94:615.274]

Thiotriazoline Influence on the Nitric Oxide Indicators under the Conditions of Experimental Bronchial Asthma*Kolishetska M.*

Abstract. The purpose of the research is to examine the activity of nitric oxide synthase (endothelial and inducible), arginase activity of peripheral blood lymphocytes of Guinea pigs with experimental asthma before and after thiotriazoline treatment.

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, Ukrainian Law 3447-IV «Animals protection against cruelty», the general ethics of animal experimentation adopted by the first national Congress on bioethics in Ukraine (2001). The researches were carried out on 180 Guinea-pigs. The weight of each one was 180–220 g. They were divided into 6 groups for 30 animals in each. Among the first group (control) there were intact Guinea-pigs. Among the II group there were animals with an experimental BA (on 5th day of experiment). Among the III group there were Guinea-pigs on the 19th day of the experiment. The IV group consisted of animals with an experimental BA (on 26th day of the experiment), the V group included Guinea-pigs with an experimental BA (33rd day) and the VI – guinea-pigs with BA on 33 days after treatment with thiotriazoline which was given intramuscularly at a dose of 100 mg weight for 10 days. 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 (0.1ml 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 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 such 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.

Research results. As a result of current study there were changes found in the activity of arginase-NO-synthase system of blood lymphocytes, which improve arginase activity of lymphocytes and increased activity of inducible NO-synthase and, at the same time, compensatory inhibition activity of endothelial isoforms of NOS in blood, thus these indexes were most expressed on the late stages of her forming (33rd day). The use of thiotriazoline in curative aims stipulated the decline of arginase lymphocyte activity on 32,5% ($r \leq 0,05$), considerable increase of content of eNOS in blood on 51,1% ($r \leq 0,05$) and decline of iNOS on 32,1% ($r \leq 0,05$) at experimental asthma as compared to the group of animals that did not yield to influence of this medication.

Conclusions. Thus, according to obtained data, thiotriazoline usage showed correcting influence on the changed indexes of metabolism of nitric oxide in peripheral blood of guinea-pigs at the terms of experimental bronchial asthma development.

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

Стаття надійшла 02.09.2017 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування