

### Реферат

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА «КОРДИЦЕПС И ЛИНЧЖИ» НА КИСЛОРОДЗАВИСИМЫЙ МЕТАБОЛИЗМ ФАГОЦИТОВ РАЗЛИЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ

Макаренко А.Н., Рудик М.П., Позур В.В., Святецкая В.Н., Довгий Р.С.

Ключевые слова: «Кордицепс и Линчжи», мононуклеары крови, перитонеальные макрофаги, кислородзависимый метаболизм.

Исследовали влияние средства «Кордицепс и Линчжи» на кислородзависимый метаболизм перитонеальных макрофагов мышей и мононуклеаров крови человека. Показано, что средство стимулировало показатели кислородзависимого метаболизма исследуемых фагоцитирующих клеток. Наибольший эффект «Кордицепс и Линчжи» оказывал на моноциты крови человека, а именно внесение средства в концентрации 200 мкг/мл стимулировало кислородзависимый метаболизм в 50 раз по сравнению с контролем.

### Summary

EFFECT OF "CORDICEPS AND LINCHZHI" ON OXYGEN-DEPENDENT METABOLISM OF PHAGOCYTES OF DIFFERENT POPULATIONS

Makarenko O.M., Rudyk M.P., Pozur V.V., Sviatetska V. N., Dovgiy R.S.

Keywords: "Cordiceps and Linchzhi", blood mononuclear, peritoneal macrophages, oxygen-dependent metabolism.

This paper presents the study aimed to investigate the effects produced by effect of "Cordiceps and Linchzhi" on oxygen-dependent metabolism of human peritoneal macrophages and blood mononuclears. It has been found out this medication stimulates the indices of oxygen-dependent metabolism of phagocytes under the observation. The most marked effect is produced by "Cordiceps and Linchzhi" on the human monocytes. The introduction of the medicine in concentration of 200 µg/ml increases the rate of oxygen-dependent metabolism in 50 times compared to the control group.

УДК 616.831-008.9 –092.9

**Френкель Ю.Д.**

## **РОЛЬ NO-СИНТАЗ У МЕХАНІЗМАХ ПОРУШЕНЬ ОКИСНЮВАЛЬНОГО МЕТАБОЛІЗМУ У ТКАНИНІ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЗА УМОВ ХРОНІЧНОЇ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ГІПОМЕЛАТОНІЕМІЇ**

Миколаївський національний університет ім. В.О. Сухомлинського, м. Миколаїв

*У експерименті на 25 білих щурах досліджено роль функціонального стану NO-синтаз (NOS) у механізмах порушень окиснювального метаболізму у тканині головного мозку при хронічній гіпомелатоніемії, яку відтворювали шляхом цілодобового освітлення тварин у дозі 1500 лк протягом 55 діб. Виявлено, що за цих умов функціонування нейрональної NOS обмежує рівень утворення супероксидного аніон-радикала дихальним ланцюгом мітохондрій і активацію пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) у тканині великих півкуль головного мозку. У той же час, функціонування індуцибельної NOS сприяє гіперпродукції супероксиду, активації ПОЛ, що супроводжується зниженням антиоксидантного потенціалу, активності супероксиддисмутази. Застосування L-аргініну за умов експерименту обмежує активацію ПОЛ, підвищує активність каталази у тканині великих півкуль головного мозку.*

Ключові слова: гіпомелатоніемія, оксид азоту, NO-синтази, оксидативний стрес, головний мозок.

*Стаття є фрагментом планової НДР Миколаївського національного університету ім. В.О. Сухомлинського „Вплив мелатоніну на функції систем організму” (№ держреєстрації 0106U002994).*

Відтворення гіпомелатоніемії шляхом цілодобового освітлення щурів у дозі 1500 люкс, за нашими попередніми даними, супроводжується прогресуючим збільшенням продукції  $\cdot O_2^-$  НАДФН-оксидазними комплексами: міросом та лейкоцитів (починаючи з 30 доби експерименту) та дихальним ланцюгом мітохондрій (на 55 добу експерименту), активацією пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) (на 55 добу експерименту), прогресуючим зниженням активності антиоксидантних (АО) ферментів: СОД і каталази (починаючи з 10 доби дослідження), глутатіонпероксидази (на 55 добу експерименту) [7].

В останні роки показана здатність мелатоніну пригнічувати активність індуцибельної NO-синтази (iNOS) [13] та збільшувати активність

нейрональної (nNOS) [11]. Саме з активністю iNOS найчастіше пов'язують ініціацію окиснювального стресу у тканині головного мозку за умов його гіпоксії, ішемії / реперфузії, запалення [3, 6].

Проте NO-залежні механізми порушення вільнорадикальних окиснювальних процесів за умов гіпомелатоніемії залишаються нез'ясованими.

### Мета роботи

Вивчення ролі функціонального стану NO-синтаз (NOS) у механізмах порушень окиснювального метаболізму у тканині головного мозку за умов хронічної експериментальної гіпомелатоніемії.

### Матеріали та методи

Дослідження були проведені на 25 білих щурах лінії Вістар масою 180-220 г у таких серіях дослідів: у першій - необхідні показники вивчали у інтактних тварин (контрольна серія), у другій – після відтворення хронічної гіпомелатоніемії; у третій, четвертій і п'ятій серіях – на тлі хронічної гіпомелатоніемії тваринам вводили відповідно селективний інгібітор nNOS – 7-нітроіндазол (7-NI), селективний інгібітор iNOS – аміногуанідин, субстрат NOS – L-аргінін.

Хронічну гіпомелатоніемію моделювали шляхом цілодобового освітлення (1500 лк) щурів терміном 55-ти діб [7]. Зазначені вище сполуки вводили щоденно протягом останніх 7 діб освітлення тварин внутрішньоочеревинно: 7-NI – 30 мг/кг [9], аміногуанідин – 20 мг/кг [10] та L-аргінін – 500 мг/кг [1]. Евтаназію тварин виконували методом дислокації шийних хребців під ефірним наркозом. Об'єктом дослідження були великі півкулі головного мозку.

Утворення супероксидного аніон-радикала ( $O_2^-$ ) у гомогенаті тканини головного мозку оцінювали при проведенні тесту з нітросинім тетразолієм з індукторами у вигляді НАДН, НАДФН і пірогеналу для оцінки продукції  $O_2^-$  відповідно мітохондріальним і мікросомальним електронно-транспортними ланцюгами (ЕТЛ), а також НАДФН-оксидазним комплексом лейкоцитів [8].

Утворення супероксидного аніон-радикала ( $O_2^-$ ) у гомогенаті тканини головного мозку оцінювали при проведенні тесту з нітросинім тетразолієм з індукторами у вигляді НАДН, НАДФН і пірогеналу для оцінки продукції  $O_2^-$  відповідно мітохондріальним і мікросомальним електронно-транспортними ланцюгами (ЕТЛ), а також НАДФН-оксидазним комплексом лейкоцитів [8].

Рівень ПОЛ у тканині головного мозку оцінювали за утворенням у реакції тіобарбітурової кислоти (ТБК) з ТБК-активними продуктами забарвленого триметінового комплексу до і після 1,5-годинної інкубації [4]. Активність АО системи оцінювали за приростом концентрації ТБК-активних продуктів за час півторагодинної інкубації у залізоаскорбатному буферному розчині, а також за активністю АО ферментів – супероксиддисмутази (СОД) та каталази [4].

Отримані дані піддавали статистичній обробці. Для перевірки розподілу на нормальність було застосовано розрахунок критерію Шапіро-Вілка. Якщо дані відповідали нормальному розподілу, то для їх порівняння використовували t-критерій Ст'юдента для незалежних вибірок. У випадку, коли ряди даних не підлягали нормальному розподілу, статистичну обробку здійснювали, використовуючи непараметричний метод – тест Мана-Вітні. Статистичні розрахунки проводили з використанням програм "StatisticSoft 6.0".

### Результати дослідження та їх обговорення

Введення 7-NI на тлі цілодобового освітлення тварин протягом 55-ти діб підвищує продукцію у

тканині головного мозку  $O_2^-$  мітохондріальним ЕТЛ – відповідно в 2,4 рази ( $p<0,001$ ) та на 20,4% ( $p<0,01$ ) у порівнянні з даними першої та другої серій (див. табл.).

Таблиця

Вплив інгібіторів і субстрату NOS на показники вільнорадикального окиснення й АО системи в тканині головного мозку за умов хронічної гіпомелатоніемії (M±m, n=25)

Показники	Серії дослідів				
	Інтактні тварини	Гіпомелатоніемія (55 діб)			
		Контроль	+ 7-NI	+ аміно-гуанідин	+ L-аргінін
Продукція $O_2^-$ , нмоль/г-с					
мікросомальним ЕТЛ	11,75±0,80	18,02±0,88*	18,52±1,34*	15,04±0,93 */**	17,62±1,57*
мітохондріальним ЕТЛ	9,17±1,21	18,62±0,98*	22,41±0,56 */**	11,42±0,95**	16,02±1,38*
НАДФН-оксидазою лейкоцитів	1,17±0,08	1,74±0,08*	1,94±0,17*	1,49±0,07 */**	1,71±0,15*
Концентрація ТБК-реактантів, мкмоль/кг					
до інкубації	30,9±6,1	61,8±0,6*	66,8±1,2 */**	51,2±1,6 */**	55,8±1,7 */**
після інкубації	43,2±4,82	86,0±0,4*	93,4±1,1 */**	71,0±1,4 */**	79,6±1,4 */**
приріст	12,3±1,4	24,2±0,1*	26,6±0,3 */**	19,8±0,4 */**	23,8±0,4 *
СОД, од. акт.	0,52±0,04	0,24±0,02*	0,15±0,03 */**	0,38±0,05**	0,27±0,05*
Каталаза, мккатал/кг	5,22±0,19	3,28±0,17*	3,02±0,23*	4,58±0,17 */**	4,07±0,19 */**

Примітка: \* –  $p<0,05$  у порівнянні з даними інтактних щурів;  
\*\* –  $p<0,05$  у порівнянні з даними другої серії.

Проте внесення 7-NI не призводить до достовірних змін вироблення  $O_2^-$  НАДФН-оксидазними системами мікросом і лейкоцитів.

За умов пригнічення nNOS у тканині мозку підвищується концентрація ТБК-реактантів до інкубації – на 8,1% ( $p<0,01$ ), після інкубації – на 8,6% ( $p<0,001$ ) у порівнянні з даними другої серії. Приріст концентрації ТБК-реактантів за час інкубації у залізоаскорбатному буферному розчині також збільшується (на 9,9%,  $p<0,001$ ) у порівнянні з даними другої серії. Активність СОД – знижується – на 37,5% ( $p<0,05$ ), активність ка-

талази – істотно не змінюється.

Отримані нами дані вказують на той факт, що за умов експерименту функціональна активність nNOS у тканині мозку обмежує процес активації ПОЛ та підтримує АО потенціал.

Введення аміногуанідину на тлі цілодобового освітлення тварин протягом 55-ти діб обмежує

продукцію  $O_2^-$  у тканині головного мозку щурів мікросомальним ЕТЛ – на 16,5% ( $p<0,05$ ), мітохондріальним ЕТЛ – на 38,7% ( $p<0,001$ ), НАДФН-оксидазним комплексом лейкоцитів – на 14,4% ( $p<0,05$ ) у порівнянні з даними другої се-

рії. Концентрація ТБК-реактивів знижується: до інкубації – на 17,2% ( $p < 0,001$ ), після інкубації – на 17,4% ( $p < 0,001$ ). Приріст концентрації ТБК-реактивів за час інкубації у залізоаскорбатному буферному розчині також зменшується (на 18,2%,  $p < 0,001$ ). Активність СОД і каталази – підвищується – відповідно на 58,3% ( $p < 0,05$ ) та 39,6% ( $p < 0,001$ ).

Отримані нами дані вказують на той факт, що

продукція  $O_2$  мікросомальним, мітохондріальним ЕТЛ і НАДФН-оксидазою лейкоцитів, інтенсивність ПОЛ, зниження АО потенціалу та активності АО ферментів у тканині головного мозку щурів за умов хронічної експериментальної гіпомелатоніемії пов'язані з функціональною активністю iNOS.

Введення L-аргініну на тлі цілодобового освітлення тварин протягом 55-ти діб достовірно не

впливає на вироблення  $O_2$  зазначеними ЕТЛ у тканині головного мозку щурів у порівнянні з даними другої серії. Проте за цих умов знижується концентрація ТБК-реактивів до інкубації – на 9,7% ( $p < 0,02$ ), після інкубації – на 7,4% ( $p < 0,01$ ) у порівнянні з даними другої серії. Приріст концентрації ТБК-реактивів у залізоаскорбатному буферному розчині при цьому достовірно не змінюється. Активність каталази підвищується – на 24,1% ( $p < 0,02$ ), активність СОД – достовірно не змінюється.

Таким чином, отримані нами результати підтверджують уявлення про неоднозначну роль NO у розвитку нейродеструкції (“NO-парадокс”), який, очевидно, пов'язаний з відмінностями функціональної компартиментизації конститутивних та індукційної NO-генеруючих систем [2].

NO, що утворюється у великій кількості iNOS (за умов відсутності пригнічуючого впливу мелатоніну), здатний брати участь у ланцюгових вільнорадикальних процесах, в ході яких поряд з продовженням і обривом ланцюгів можуть здійснюватися і реакції розмноження активних

центрів [5]. У реакції NO з  $O_2$  утворюється високоактивна прооксидантна сполука – пероксинітрит, яка приєднуючи протон, розпадається протягом секунди, надаючи сильний окисний вплив на різні внутрішньоклітинні мішені [12].

### Висновки

1. За умов хронічної експериментальної гіпомелатоніемії функціонування pNOS обмежує рівень утворення супероксидного аніон-радикала мітохондріальним ЕТЛ і активацію пероксидного окиснення ліпідів у тканині великих півкуль головного мозку щурів. Застосування селективного інгібітору pNOS 7-нітроіндазолу за цих умов значно підвищує продукцію суперокси-

дного аніон-радикала мітохондріальним ЕТЛ, сприяє активації ліпопероксидації, пригнічує антиоксидантний потенціал, знижує активність СОД.

2. За умов хронічної експериментальної гіпомелатоніемії функціонування iNOS викликає гіперпродукцію супероксидного аніон-радикала, активацію пероксидного окиснення ліпідів у тканині великих півкуль головного мозку, що супроводжується зниженням антиоксидантного потенціалу, активності супероксиддисмутази. Введення селективного інгібітору iNOS аміногуанідину обмежує вказані порушення.

3. Застосування L-аргініну за умов хронічної експериментальної гіпомелатоніемії обмежує активацію пероксидного окиснення ліпідів, підвищує активність каталази у тканині великих півкуль головного мозку.

### Література

1. Дробінська О. Вплив L-аргініну на ураження в слизовій оболонці шлунка, спричинені серотоніном / О. Дробінська, Л. Остапченко, О. Цирюк [та ін.] // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. – 2004. – Вип. 38. – С. 201-204.
2. Костенко В.О. Механізми ауторегуляції утворення оксиду азоту в організмі ссавців та їх порушення при розвитку патологічних процесів / В.О. Костенко, Н.В. Соловйова, О.В. Коваленко [та ін.] // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2011. – Т. 11, №3. – С. 150-154.
3. Куровська В.О. Роль оксиду азоту в ішемічних і ішемічно-реперфузійних ушкодженнях головного мозку / В.О. Куровська, В.П. Пішак, С.С. Ткачук // Буковинськ. мед. вісн. – 2008. – Т. 12, №4. – С. 143-149.
4. Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині / [Л.В. Беркало, О.В. Бобович, Н.О. Боброва та ін.]; за ред. І.П.Кайдашева. – Полтава, 2003. – 320 с.
5. Осипов А.Н. Биологическая роль нитрозильных комплексов гемопротеинов / А.Н. Осипов, Г.Г. Борисенко, Ю.А. Владимиров // Усп. биол. хим. – 2007. – Т. 47. – С. 259-292.
6. Проблема оксида азота в неврологии / [В.А. Малахов, А.Н. Загородня, В.С. Лычко и др.]. – Сумы : Изд-во СумГПУ им. А.С.Макаренко, 2009. – 242 с.
7. Френкель Ю.Д. Прооксидантно-антиоксидантная система головного мозга крыс при гипо- и гипермелатонинемиях / Ю.Д.Френкель, О.И.Цебржинский // Высокие технологии. фундаментальные и прикладные исследования в физиологии, фармакологии и медицине. – Т. 1. – [сб. ст.] - науч. ред. А.П. Кудинов, Б.В. Крылов. - СПб, 2011. – С. 203-208.
8. Цебржинский О.И. Дифференцированное спектрофотометрическое определение продукции супероксида в тканях НСТ-тестом / О.И. Цебржинский // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2002. – Т. 2, №1. – С.96-97.
9. Laude K. NO produced by endothelial NO synthase is a mediator of delayed preconditioning-induced endothelial protection / K. Laude, J. Favre, C. Thuillez [et al.] // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. – 2003. – V. 284, №6. – P. H2053-H2060.
10. Takeuchi K. Role of endogenous nitric oxide (NO) and NO synthases in healing of indomethacin-induced intestinal ulcers in rats / K. Takeuchi, R. Hatazawa, M. Tanigami [et al.] // Life Sci. – 2007. – V. 80, №4. – P. 329-336.
11. Sarti P. New evidence for cross talk between melatonin and mitochondria mediated by a circadian-compatible interaction with nitric oxide / P. Sarti, M.C. Magnifico, F. Altieri [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2013. – V. 14, №6. – P. 11259-11276.
12. Szabó S. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics / C. Szabó, H. Ischiropoulos, R. Radi // Nature Reviews. – 2007. – V. 6. – P. 662-680.
13. Vilar A. Melatonin suppresses nitric oxide production in glial cultures by pro-inflammatory cytokines through p38 MAPK inhibition / A. Vilar, L. de Lemos, I. Patraca [et al.] // Free Radic. Res. – 2014. – V.48, №2. – P. 119-128.

### **Реферат**

РОЛЬ NO-СИНТАЗЫ В МЕХАНИЗМАХ НАРУШЕНИЙ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА В ТКАНИ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПОМЕЛАТОНИНЕМИИ

Френкель Ю.Д.

Ключевые слова: гипомелатонинемия, оксид азота, NO-синтазы, оксидативный стресс, головной мозг.

В эксперименте на 25 белых крысах исследована роль функционального состояния NO-синтаз (NOS) в механизмах нарушений окислительного метаболизма в ткани головного мозга при хронической гипомелатонинемии, воспроизведенной путем круглосуточного освещения животных в дозе 1500 лк в течение 55 суток. Выявлено, что в этих условиях функционирование нейрональной NOS ограничивает уровень образования супероксидного анион-радикала дыхательной цепью митохондрий и активацию перекисного окисления липидов (ПОЛ) в ткани больших полушарий головного мозга. В то же время, функционирование индуцибельной NOS способствует гиперпродукции супероксида, активации ПОЛ, что сопровождается снижением антиоксидантного потенциала, активности супероксиддисмутазы. Применение L-аргинина в условиях эксперимента ограничивает активацию ПОЛ, повышает активность каталазы в ткани больших полушарий головного мозга.

### **Summary**

ROLE OF NO-SYNTHASES IN THE MECHANISM OF OXIDATIVE METABOLIC DISTURBANCES IN CEREBRAL TISSUES UNDER CHRONIC MODELED HYPOMELATONINEMIA

Frenkel Yu.D.

Key words: hypomelatoninemia, nitric oxide, NO-synthases, oxidative stress, cerebrum.

The experiment carried out 25 white rats was designed to study the role of the functional state of NO-synthases (NOS) in the mechanisms of disorders of oxidative metabolism in brain tissue under chronic modeled hypomelatoninemia (animals were exposed to steady illumination at a dose of 1500 lux for 55 days). We have found out in these conditions the functioning of neuronal NOS level limits the formation of superoxide anion radical by the respiratory chain of mitochondria as well as the activation of lipid peroxidation (LPO) in cerebral tissues. At the same time, the functioning of inducible NOS causes superoxide hyperproduction, LPO activation that is accompanied by the decrease in antioxidant capacity, superoxide dismutase activity. The use of L-arginine in the modeled conditions limits the activation of LPO, increases the activity of catalase in cerebral tissues.