УДК: 616.13/.16-002:616.155.321]-018.27:615.225-092.9

В.В. Чоп'як, Г.О. Потьомкіна, І.В. Вальчук, Л.А. Любінець, М.О. Качмарська, О.В. Садляк

Вплив корвітину на NO-залежні і месенджерні механізми в ендотеліоцитах щурів за умов експериментального імунокомплексного васкуліту

Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького, кафедра клінічної імунології та алергології, кафедра патологічної фізіології

Ключові слова: ендотеліоцит • оксид азоту • корвітин

Науково-дослідні роботи останнього часу засвідчують, що в основі розвитку імунокомплексного ушкодження судин з подальшим формуванням васкулітів лежать порушення процесів синтезу оксиду азоту (NO). Недостатність синтезу NO ендотеліальними клітинами призводить до посиленої експресії адгезивних молекул, розвитку оксидативного стресу і підвищення активності ядерних факторів транскрипції, які регулюють активність генів, відповідальних за розвиток запальних процесів, що може призводити до формування важких системних патологій. У звязку з цим актуальною є рання діагностика цього патологічного процесу, а також і його корекція, що може грунтуватись на оцінці механізмів розвитку імунокомплексного ушкодження судин.

Мета роботи – вивчення впливу корвітину на процеси синтезу NO, а саме: активність iNOS і cNOS, рівень метаболітів NO_2^- - та NO_3^- -аніонів та циклічних нуклеотидів – цАМФ і ЦГМФ в ендотеліоцитах черевної аорти білих щурів при експериментальному імунокомплексному васкуліті (ЕІВ) в умовах in vitro і in vivo.

Матеріали і методи. Для відтворення моделі ЕІВ у хвостову вену щура кожні 7 днів упродовж 12 тижнів вводили бичачий сироватковий альбумін з розрахунку 100 мг/кг маси тіла. Розчин корвітину вводили в дозі 40мг/кг раз на добу впродовж 10 днів. Для оцінки активності NO-синтаз (індуцибельної і конститутивної) використовували класичний метод пристосований до спектрофотометричного визначення одного з продуктів реакції – нітрит-аніону. Кількість NO_2^- визначали в колориметричній реакції за допомогою реактиву Грісса. Кількість NO_3^--аніонів визначали спектрофотометричним методом з використанням бруцину. Рівень цАМФ і цГМФ – радіоімунним методом. Інкубацію клітин проводили в 24 лункових пластикових планшетах з використанням вставок із напівпроникними мембранами з діаметром пор 3 м. У лунку планшети вносили по 200 мкл суспензії ендотеліоцитів ($3 \cdot 10^6$/мл) та нейтрофілів у співвідношенні 1:1 та розчин корвітину в дозі $1 \cdot 10^{-4}$ г/л. Клітини інкубували в термостаті при 37^0C в атмосфері з 5% CO_2 впродовж 1 год.

Результати та їх обговорення. В результаті проведених нами досліджень встановлено, що сумісна інкубація ендотеліоцитів з нейтрофілами тварин з ЕІВ призводить до порушення синтезу NO в едотеліальних клітинах. Виявлено зниження вмісту NO_2^--аніонів на 50% до 61,02±4,47 пмоль/мг білка ($P<0,05$), збільшення вмісту NO_3^--аніону в 2,6 рази до 9,50±1,15 нмоль/мг білка ($P<0,01$) з одночасним підвищенням активності iNOS на 65% до 7,93±1,35 пмоль/мг білка ($P<0,05$), без будь-яких вірогідних змін активності cNOS та вмісту циклічних нуклеотидів у порівнянні з клітинами інкубованими без нейтрофілів. Отримані результати дозволяють припустити, що при ЕІВ нейтрофіли прямо або опосередковано можуть призводити до порушення процесів синтезу NO в ендотеліальних клітинах, що спричиняє порушення функціональної здатності ендотелію і призводить до ушкодження судин, внаслідок гальмування фізіологічної ролі NO та прояву його цитотоксичної дії.

За умов присутності корвітину в інкубаційному середовищі спостерігали підвищення рівеня NO_2^-- аніону майже в 4 рази до 235,07±18,91 пмоль/мг білка ($P<0,01$) та зниження активності iNOS до 1,99±0,28 пмоль/мг білка ($P<0,05$). Активність cNOS в присутності корвітину не змінювалась. Окрім того, в ендотеліальних клітинах щурів з ЕІВ, при їх інкубації з нейтрофілами в присутності корвітину, виявлено збільшення рівня цАМФ на 66% до 57,62±6,10 фмоль/мг білка ($P<0,05$) та цГМФ на 121% до 9,88±1,64 фмоль/мг білка ($P<0,05$).

Дослідження впливу корвітину на процеси синтезу оксиду азоту в ендотеліальних клітинах при ЕІВ за умов його парентерального введення показали, що введення препарату дослідним тваринам також призводить до зростання рівня NO_2^-- і NO_3^--аніонів на 94 % до 268,90±38,26 пмоль/мг і на 108% до 18,91±2,29 нмоль/мг білка ($P<0,001$) відповідно. Встановлено також і збільшення активності cNOS на 141% до 20,49±2,39 пмоль/мг білка ($P<0,01$), однак вірогідних змін активності iNOS не було виявлено, спостерігалась лише тенденція до її зниження. Аналіз даних вмісту циклічних нуклеотидів показав також, що введення корвітину супроводжується підвищенням рівня цАМФ на 136% – до 60,64±7,20 фмоль/мг білка ($P<0,01$) та цГМФ на 58% – до 6,04±0,78 фмоль/мг білка ($P<0,05$).

Висновки

1. В умовах in vitro нейтрофіли щурів з ЕІВ здатні впливати на процеси синтезу оксиду азоту в ендотеліальних клітинах викликаючи зниження рівня його метаболітів – NO_2^-- і NO_3^--аніонів та активацію iNOS
2. Корвітин проявляє регуляторну роль на процеси синтезу NO як в умовах in vitro, так і при його парантеральному введенні, викликаючи підвищення рівня NO_2^-- і NO_3^--аніонів, активності cNOS та підвищує рівень циклічних нуклеотидів у ендотеліальних клітинах щурів з ЕІВ.

©В.В. Чоп'як, Г.О. Потьомкіна, І.В. Вальчук, Л.А. Любінець, М.О. Качмарська, О.В. Садляк, 2008