УДК 616.33-002.44:539.1.047

СТАН АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ ТИМОЦИТІВ ЩУРІВ В УМОВАХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО УЛЬЦЕРОГЕНЕЗУ

В. А. КОВАЛЬОВА, Л. М. ГАЙДА, А. Є. ШЕВЧЕНКО, Д. В. ШЕЛЕСТ, Л. І. ОСТАПЧЕНКО

ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Україна;
e-mail: vikikov@univ.kiev.ua

Особливості вільнорадикальних процесів та їх вплив на реалізацію імунокомпетентними клітинами, зокрема тимоцитами, своїх функцій в умовах розвитку виразкової хвороби сьогодні ще недостатньо вивчені. Встановлено, що за обох моделей виразок (стресової і етанолової) в тимоцитах щурів спостерігається зниження активності каталази в 1,7 і 3,4 раза відповідно, а глутатіонпероксидази ~ у 2,0 рази відносно контролю. У разі застосування стресової моделі також виявлено зниження активності СОД в 1,5 раза та підвищення активності глутатіонтрансферази в 1,8 раза порівняно з контролем, на відміну від етанолової моделі виразки шлунка. Зростання активності глутатіонтрансферази можна розглядати як адаптацію в умовах стресу. Одержані результати свідчать про зниження активності антиоксидантної системи тварин в умовах експериментального ульцерогенезу і підтверджують комплексну негативну дію виразки шлунка на організм.

Ключові слова: етанолова та стресова моделі виразки шлунка, антиоксидантні ензими, глутатіонпероксидаза, глутатіонтрансфераза, супероксиддисмутаза, каталаза.

За статистикою виразкова хвороба (ВХ) залишається надзвичайно розповсюдженою в більшості європейських країн та США [1]. Рівень смертності від медіогастральних виразок є вищим порівняно з їх дуоденальною локалізацією. На сьогодні із «виразкової хвороби» виділено групу переважно гострих симптоматичних виразок – стресових, медикаментозних, ендокринних та, власно, симптоматичних, які зумовлені дією певного етіологічного фактора. Для ВХ характерний хронічний перебіг, під час якого відбувається прогресування хвороби та втягнення в патологічний процес інших органів травної (печінки, підшлункової залози) та імунної систем.

Розвитку виразкових уражень сприяють порушення механізмів захисту слизової оболонки шлунка (СОШ), що спричинює підвищення її проникності для різних чужорідних субстанцій, їх сенсибілізацію та подальший розвиток запальної реакції. Тому об'єктом особливої уваги дослідників є імунологічний аспект регуляції процесів фізіологічної і репаративної регенерації СОШ. Експериментальні дані дозволяють стверджувати, що репаративна регенерація тісно пов'язана зі системою гуморального та клітинного імунітету. Не дивлячись на досить значні зміни показників специфічного і неспецифічного захисту в разі ВХ, основна частина даних літератури зосереджена на Т-клітинній ланці імунітету. Частіше ці зміни виявляються в зменшенні відносної та абсолютної кількості Т-лімфоцитів та зниженні їхньої функціональної активності.

Встановлено, що формування імунної відповіді тісно пов'язано зі змінами вільнорадикальних реакцій.

Припускається, що на всіх етапах імунного реагування вільні радикали та їх похідні здійснюють регуляторну функцію та можуть сприяти пригніченню або активації імунних реакцій за рахунок двох головних механізмів: зміни стану клітинних мембран і прямої інгібувальної дії на синтез ДНК. Показано участь вільнорадикальних продуктів у реалізації кілерної функції лімфоцитів,

антимікробному захисті фагоцитів, а також у розвитку імуносупресії за гіперактивації останніх.

Однак сьогодні є недостатньо вивченими особливості вільнорадикальних процесів та їх вплив на реалізацію імунокомпетентними клітинами своїх функцій в умовах розвитку ВХ. Дослідження особливостей функціонування імунної системи в умовах ВХ необхідне не тільки для розуміння закономірностей розвитку патологічного процесу, але й для прогнозування перебігу захворювання та формування відповідної імунокоригуючої терапії.

У наших попередніх дослідженнях було встановлено накопичення продуктів пероксидації ліпідів (ПОЛ) – дієнових кон'югатів, малонового діальдегіду, шифових основ – у тимоцитах щурів, що свідчить про активацію вільнорадикального окислення. Протидію оксидативному стресу створюють основні компоненти клітинної системи антиоксидантного захисту – супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, глутатіонпероксидаза, глутатіонтрансфераза, глутатіонредуктаза.

Аналіз стану імунного статусу в усіх хворих до лікування ВХ виявляє порушення субпопуляційного складу лімфоцитів [2]: помірно виражений Т-імунодефіцит, який характеризується зниженням вмісту в крові Т-лімфоцитів, а саме Т-хелперів і Т-супресорів. Функціональний стан антиоксидантної системи (АС) в лімфоїдних клітинах оцінюється їхнею здатністю до формування адекватної імунної відповіді, регуляції процесів диференціації та формування стійкості до апоптозу.

Метою роботи було визначити ензиматичну активність антиоксидантних ензимів (супероксиддисмутази, каталази, глутатіонтрансферази та глутатіонпероксидази) в тимоцитах щурів в умовах експериментальних моделей виразок (етанолової та стресової).

Матеріали і методи

В дослідах використовували вибірки з 10 білих нелінійних щурів *Rattus norvegicus* обох статей масою 200 г. Тварин утримували на стандартному раціоні віварію, за добу до проведення дослідів вони мали доступ лише до води [3].

Етанолові виразки спричинювали методом Окабе [4]. Для цього щурам *per os* вводили 1 мл етанолу в концентрації 80%.

З метою одержання нейродистрофічних уражень шлунка за моделлю іммобілізаційного стресу в модифікації С. Д. Гройсмана та Т. Г. Каревіної, так званого «соціального стресу» [5], щурів розміщували в металевих перфорованих патронах зі скляним вікном у донній частині, де розміщується голова щура. Патрони з тваринами поміщали в колонії вільноіснуючих щурів, в яких створювали умови для їх природного існування (освітлення, вода, корм). Через 24 год щурів виймали з патронів та декапітували під легким ефірним наркозом. Отримували тимус та виділяли тимоцити [6].

У роботі було використано реактиви фірми Lachema (Чехія), реактиви та органічні розчинники кваліфікації хч або чда (Хімлаборреактив, Україна), фільтрувальний папір FN 23 (Filtrak, Німеччина).

Ензиматичну активність СОД та каталази визначали спектрофотометрично за методами [7, 8], активність глутатіонпероксидази – за кількістю окисленого глутатіону, який не прореагував із пероксидом водню. Вміст останнього встановлювали за допомогою реактива Еллмана [9], активність глутатіонтрансферази оцінювали за швидкістю утворення кон'югату з 1-хлор-2,4-динітробензолом [10]. Кількість протеїну визначали методом Lowry [11].

Результати та обговорення

Антиоксидантні ензими – супероксиддисмутаза (СОД) та каталаза – одні з найпоширеніших в організмі. Вони представлені в різноманітних клітинах, але найбільше їх у клітинах нирок, печінки та еритроцитах [12]. СОД безпосередньо знешкоджує супероксид аніон-радикал шляхом дисмутації в пероксид водню та кисень.

H_2O_2 легко дифундує із клітини та метаболізується за участю каталази або пероксидази з утворенням води. В умовах накопичення в клітині пероксид водню за взаємодії із супероксидним аніоном може утворювати гідроксил-радикал, який є сильним окисником і основним фактором окисної модифікації клітинних структур, що спричинює значні пошкодження молекул ДНК та мутації, які можуть призводити до патології та загибелі клітин або їх злоякісного переродження. Крім того, пероксид водню є месенджерною молекулою, що за достатньо високих концентрацій активує за-

пуск проапоптичних сигнальних каскадів. Значення СОД для живих організмів було показано на мишах, в яких повністю була відсутня мітохондріальна ізоформа СОД. Такі тварини виживали лише протягом кількох днів після народження і гинули внаслідок розвитку сильного оксидативного стресу [13].

Нашими дослідженнями показано, що загальна активність СОД в тимоцитах щурів в умовах стресової виразки знижується в 1,5 раза, а в умовах етанолової – не змінюється відносно контролю (табл. 1).

Зниження активності СОД у тимоцитах в умовах стресової виразки свідчить про наявність у клітинах високого вмісту кисневих метаболітів, зокрема пероксиду водню, який безпосередньо може інгібувати цитозольну ізоформу ензиму.

Наступним етапом функціонування системи антиоксидантного захисту є регуляція внутрішньоклітинного вмісту H_2O_2, яка здійснюється каталазою та глутатіонпероксидазою. Каталаза є гемвмісним ензимом, що переважно локалізований в пероксисомах або мікропероксисомах, каталізує розклад пероксиду водню на воду та молекулярний кисень, захищаючи таким чином клітину від оксидативних пошкоджень [12].

За визначення загальної ензиматичної активності каталази встановлено її статистично значиме зниження: у разі стресової моделі – в 1,7 раза, а етанолової виразки – в 3,4 раза відповідно відносно контролю (табл. 1).

Отже, в умовах стресової виразки в тимоцитах щурів спостерігається зниження активності як СОД, так і каталази, що призводить до погіршення перетворення супероксид-радикала на кисень та пероксид водню, а також подальшої трансформації його на воду та кисень, що веде до надлишкового накопичення продуктів ПОЛ.

За застосування етанолової моделі встановлено зниження ензиматичної активності каталази, при цьому активність СОД не змінюється, що, в свою чергу, може призвести до накопичення пероксиду водню в клітині та утворення продуктів ПОЛ, оскільки пероксид водню, продукований внаслідок ензиматичної реакції, яку каталізує СОД, не може повністю розщеплюватись, тому що активність каталази значно нижча порівняно з контролем.

Виразкова хвороба шлунка супроводжується значними змінами в системі глутатіону. Завдяки каталітичній активності глутатіонпероксидази в клітинах відбувається відновлення H_2O_2 та гідропероксидів органічних молекул до відповідних гідроксисполук із використанням відновленого потенціалу глутатіону. Відомо, що здатність імунокомпетентних клітин швидко реагувати на будь-які зміни гомеостазу в організмі заснована на специфічному метаболізмі цих клітин [12]. Модуляція активності ензимів антиоксидантної системи тимоцитів відбувається значно раніше, ніж змінюються основні морфологічні та біохімічні показники, тому ці клітини можна вважати важливою моделлю для дослідження функціонування системи глутатіонпероксидази в умовах розвитку виразкової патології шлунково-кишкового тракту.

Під час дослідження активності глутатіонзалежних ензимів у тимоцитах щурів було встановлено, що активність глутатіонпероксидази знижується в 1,9 раза відносно контролю в умовах як стресової, так і етанолової моделей виразок (табл. 2).

Зниження активності глутатіонпероксидази, яка утилізує гідропероксиди ліпідів, можливо, пов'язано з інтенсифікацією процесів ПОЛ у мембранних структурах тимоцитів. Рівень активності глутатіонпероксидази в клітині за-

Таблиця 1. Загальна активність СОД та каталази в тимоцитах щурів в умовах експериментальних моделей виразок (етанолової та стресової), ($M \pm m$; $n = 10$)

Умови досліду	Супероксиддисмутаза, ум. од. акт./мг протеїну	Каталаза, нмоль/мг протеїну·хв
Контроль	24,69 ± 0,19	8,56 ± 0,07
За введення етанолу	29,56 ± 0,24	2,53 ± 0,02*
За стресу	16,94 ± 0,13*	5,01 ± 0,04*

Тут і в табл. 2 * $P \leq 0,05$ різниці вірогідні відносно контролю

Таблиця 2. Загальна ензиматична активність глутатіонпероксидази і глутатіонредуктази в тимоцитах щурів в умовах експериментальних моделей виразок (етанолової та стресової), (M ± m, n = 10)

Умови досліду	Глутатіонпероксидаза, мкМ/хв·мг протеїну	Глутатіонтрансфераза, мкМ/хв·мг протеїну
Контроль	62,81 ± 0,50	3,72 ± 0,03
За введення етанолу	32,83 ± 0,26*	4,02 ± 0,03
За стресу	30,21 ± 0,24*	6,78 ± 0,05*

лежить від роботи глутатіонредуктази, яка відновлює окислений глутатіон. Однак треба зазначити, що, метаболізуючи -ROOH, глутатіонпероксидаза може попереджати накопичення вторинних продуктів пероксидації, але вона нездатна знешкодити їх на відміну від глутатіонтрансферази.

Глутатіонтрансфераза успішно метаболізує вторинні метаболіти шляхом кон'югації з GSH. Це універсальний ензим, який запобігає пошкодженню ДНК та мітохондрій реактивними метаболітами, і, як наслідок, значно збільшує стійкість клітин та організму в цілому [14].

В ході наших досліджень було встановлено зростання активності глутатіонтрансферази у 1,8 раза в тимоцитах щурів відносно контролю в умовах стресової моделі виразки (табл. 2).

Зростання активності глутатіонтрансферази можна розглядати як адаптаційну реакцію, спрямовану на посилення зв'язування токсичних сполук, що утворюються внаслідок дії активних радикалів.

Таким чином, в умовах етанолової та стресової експериментальних моделей виразки шлунка в тимоцитах щурів активність ензимів антиоксидантного захисту зазнає змін. Зазначимо, що компенсаторне зростання активності ензимів не сприяє знешкодженню токсичних продуктів пероксидації, що може бути однією із причин накопичення пошкоджень біологічних полімерів. Зокрема, «незадовільний» стан структурних елементів клітин є чинником, що стимулює апоптоз «зсередини». Пусковим елементом такого типу апоптозу є серйозні ушкодження генетичного апарату клітини та мембран (особливо мітохондрій) внаслідок ПОЛ, що разом з активацією протеїнів, які формують мегапори мітохондрій, призводить до вивільнення протеази AIF та цитохрому *c* і активації каспази-9 [15]. Вважають, що важливу роль у регуляції апоптозу за його індукції через АФК мають антиоксидантні системи захисту клітин, оскільки один зі способів регуляції клітинних функцій (а, очевидно, і апоптозу) здійснюється за допомогою динамічного балансу про- та антиоксидантних процесів [12].

Одержані результати свідчать про зниження активності антиоксидантної системи в тимоцитах щурів в умовах експериментального ульцерогенезу.

Так, за обох моделей утворення виразок спостерігається зниження активності каталази та глутатіонпероксидази. За стресової моделі також виявлено зниження активності СОД та підвищення активності глутатіонтрансферази, на відміну від етанолової моделі виразки. Можливо, це пов'язано з різницею у механізмах реалізації ульцерогенезу за різних моделей виразки або з відмінами у формуванні адаптаційних реакцій.

Таким чином, за ульцерогенезу в організмі, можливо, відбувається накопичення супероксид-іона та пероксиду водню, що веде до інтенсифікації процесів пероксидного окислення ліпідів у тимоцитах щурів.

Одержані дані підтверджують комплексну негативну дію виразки шлунка на організм.

СОСТОЯНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ТИМОЦИТОВ КРЫС В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО УЛЬЦЕРОГЕНЕЗА

В. А. Ковалева, Л. Н. Гайда, А. Е. Шевченко, Д. В. Шелест, Л. И. Остапченко

УНЦ «Институт биологии» Киевского национального университета имени Тараса Шевченко, Украина;
e-mail: vikikov@univ.kiev.ua

Особенности свободнорадикальных процессов и их влияние на реализацию иммунокомпетентными клетками (в частности, тимоцитами) своих функций в условиях развития язвенной болезни сегодня еще недостаточно изучены. Установлено, что при обеих моделях язвы (стрессовой и этаноловой) в тимоцитах крыс наблюдается снижение активности каталазы в 1,7 и 3,4 раза соответственно, и глутатионпероксидазы ~ в 2,0 раза относительно контроля. При использовании стрессовой модели также установлено снижение активности СОД в 1,5 раза и повышение активности глутатионтрансферазы в 1,8 раза по сравнению с контролем, в отличие от этаноловой модели язвы желудка. Повышение активности глутатионтрансферазы можно рассматривать как адаптивную реакцию в условиях стресса. Полученные результаты свидетельствуют об истощении антиоксидантной системы животных при экспериментальном ульцерогенезе, что подтверждает комплексное негативное воздействие язвы желудка на организм.

Ключевые слова: этаноловая и стрессовая модели язвы желудка, антиоксидантные энзимы, глутатионпероксидаза, глутатионтрансфераза, супероксиддисмутаза, каталаза.

STATE OF ANTIOXIDANT SYSTEM OF RAT THYMOCYTES IN EXPERIMENTAL ULCEROGENESIS

V. A. Kovaleva, L. M. Gaida, A. E. Shevchenko, D. V. Shelest, L. I. Ostapchenko

Educational and Scientific Centre *Institute of Biology*, Taras Shevchenko Kyiv National University, Ukraine;
e-mail: vikikov@univ.kiev.ua

Features of free radical processes and their impact on the implementation of immunocompetent cells of their functions under conditions of peptic ulcer are insufficiently studied today. Reduced activity of catalase 1.7 and 3.4 times and that of glutathione peroxidise ~ 2.0 times, accordingly, were observed in both models of gastric ulceration (stress ulcer and ethanol one). Enzymatic activity of superoxide dismutase decreased 1.5 times and activity of glutathione transferase increased 1.8 times in the stress model in contrast to the ethanol model of stomach ulcer. Obtained results indicate the exhaustion of antioxidant system in rats' thymocytes under experimental ulcerogenesis. These data confirm complex negative effect of ulcer on the organism.

Key words: model of ethanol and stress stomach ulcer, antioxidant enzymes, glutathione peroxidase, glutathione transferase, superoxide dismutase, catalase.

References

1. *Saenko V. F., Gomolyako I. V., Buryi A. N.* Peculiar properties of associated with gelicobakteriosis stomach and duodenum diseases' diagnostics and treatment in the surgical clinic // Klinichna hirurgiya. – 2001. – N 6. – P. 14–18. (In Ukrainian).
2. *Freydlyn I. S.* Immune System and its defects. S-Peterbyrg, 1998. – P. 8–9. (In Russian).

3. *Zapadnyuk I. P., Zapadnyuk V. I., Zacharya E. A., Zapadnyuk B. V.* Laboratory animals. Breeding, maintenance, use in experiment. – K.: Vishcha shkola, 1983. – 383 p. (In Russian).
4. *Practitioner's* guide of gastroenterology. Eds. by V. T. Ivashkin, S. I Rapoport. – M.: Sovetskiy Sport, 1999. – 432 p. (In Russian).
5. *Groisman S. D., Karevina T. G.* The effect of atropine on the stress damages of rats' gastric mucosal // Bibl. Ukaz. VINITI. Dep. Rukopisi. – 1979. – **131**, N 12. (In Ukrainian).
6. *Borysov S. I., Hrynyuk I. I., Kovalova V. A., Ptytsya O. M., Matyshevs'ka O. P.* Obtaining and characterization of drug cores lymphocytes of the thymus and spleen of rats // Bulletin of Kyiv Taras Shevchenko. Biology. – 1999. – **29**. – P. 12–14. (In Ukrainian).
7. *Chevary S., Andel T., J. Shtrenger Y.* Determination of antioxidant parameters and their diagnostic value in the elderly // Lab. Delo. – 1991. – N 10. – P. 9–13. (In Russian).
8. *Korolyk M. A., Ivanova L. I., Mayorova I. G.* Method of determination catalase activity // Lab. Delo. – 1988. – N 1. – P. 16–19. (In Russian).
9. *Gerush I. V., Meschishen I. V.* State of blood glutation system under experimental ulcer damage of gastroduodenal zone and effect of ehinatseya purpurova's tincture // Visn. problem biologii i mediciny. – 1998. – N 7. – P. 10–15. (In Ukrainian).
10. *Meschishen I. F.* Method of determination glutathione's activity in blood. – In.: Application of enzymes in medicine. – Simferopol, 1987. – 35 p. (In Russian).
11. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randal R. I.* Protein measurement with Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – **193**, N 1. – P. 265–275.
12. *Baraboy V. A., Sutkovoy D. A.* / Ed. U. A. Zozulya Oxidation-antioxidant homeostasis under norma and pathology. – Kyiv: Naukova dumka, 1997. – 357 p. (In Russian).
13. *Li Y., Huang T. T., Carlson E. J., Melov S., Ursell P. C., Olson J. L., Noble L. J., Yoshimura M. P., Berger C., Chan P. H., Wallace D. C., Epstein C. J.* Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase // Nat. Genet. – 1995. – **11**. – P. 376–381.
14. *Halliwell B., Gutteridge J. M.* Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy // Lancet. – 1984. – P. 1396–1397.
15. *Hotchkiss R. S., Osmon S. B., Chang K. C., Wagner T. H., Coopersmith C. M., Karl I. E.* Accelerated lymphocytedeath in sepsis occurs by both the death receptor and mitochondrial pathways // J. Immunol. – 2005. – **174**. – P. 5110–5118.

Отримано 08.10.2013