

УДК 615.033.076.9

С. К. Сумрій, О. В. Жук

КІНЕТИКА ВИВЕДЕННЯ ³H-АМІКСИНУ ТА ЙОГО МЕТАБОЛІТІВ З ОРГАНІЗМУ МИШЕЙ

Проведено вивчення процесів виведення ³H-аміксину з організму мишей при його однократному внутрішньовенному і пероральному введенні. Результати дослідження показали, що препарат та його метаболіти повільно виводяться з організму експериментальних тварин і незалежно від способу введення виводиться приблизно 60 % від уведеної дози. Характерним для екскреції досліджуваної речовини є однакова ефективність процесів екскреції з калом і сечею та моноекспоненційність процесів виведення. Для аналізу отриманих результатів було використано метод Мангельдорфа, що дозволяє здійснювати оцінку кінетичних параметрів елімінації ліків з організму.

Ключові слова: ³H-аміксин, параметри кінетики виведення, метод Мангельдорфа.

UDC 615.033.076.9

S. K. Sumry, O. V. Zhuk

ELIMINATION KINETIC OF THE ³H-AMIXIN AND ITS METABOLITES FROM THE MICE ORGANISM

³H-amixin excretion processes from the mice organism after single intravenous and per. os. administration has been carried out. The research results have shown, that the drug and its metabolites are slowly eliminated from the organism of experimental animals and independently on the way of introduction about 60% of the dose are eliminated. The equal efficacy of excretion with urea and feces and monoexponentiality of excretion processes is characteristic for the excretion of the examined substance. The Manghelsdorf's method, which allows carrying out an estimation of kinetic parameters of drugs elimination from the organism, has been developed.

Key words: ³H-amixin, elimination kinetic parameters, Manghelsdorf's method.

УДК 616.832

Т. Ю. Степанова, Т. О. Філіпова, *д-р біол. наук, проф.*,

Б. М. Галкін, *д-р біол. наук, проф.*

ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН МАКРОФАГІВ І АКТИВНІСТЬ КАТЕПСИНУ D У МИШЕЙ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ АЛЕРГІЧНИМ ЕНЦЕФАЛОМІЄЛИТОМ

Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова

Експериментальний алергічний енцефаломієліт (ЕАЕ) — автоімунне захворювання ЦНС, що індукується антигенами мієліну, подібне до розсіяного склерозу (РС) за клінічними проявами та гістологічними ознаками. У лабораторних тварин ЕАЕ є зручною моделлю для вивчення демієлінуючих захворювань людини. За останні роки було встановлено деякі механізми участі імунної системи в патогенезі РС та ЕАЕ [1]. Значну роль у цьому процесі відіграють моноцити і макрофаги.

Було виявлено, що за РС спостерігається посилення окисного метаболізму моноцитів, активується проліферація клітин-попередників макрофагів і, як наслідок, посилюється вироблення ІЛ-1, ІФН- γ , ФНП- α [2]. При цьому інду-

кується демієлінізація та посилюється поглинання продуктів деградації мієліну моноцитами і клітинами мікроглії. На наступному етапі захворювання формується функціональний дефіцит майже усіх ланцюгів імунітету. Припускають, що імунопатологія РС реалізується через гіперактивізацію початково дефіцитної системи [3]. Це свідчить про необхідність комплексного вивчення різних механізмів, які беруть участь у розвитку даного захворювання. Крім того, на різних моделях гострого запалення було показано, що нарівні з секрецією прозапальних цитокінів макрофаги активно продукують катепсини (цистеїнові протеїнази лізосом) [4].

Сьогодні ЕАЕ вважається найбільш адекватною модел-

лю РС, проте зміни в імунній системі в динаміці розвитку захворювання досліджені недостатньо. Зокрема, відсутні дані про функціональний стан макрофагів, що знаходяться поза межами ЦНС.

Метою нашої роботи було вивчення функціональної активності макрофагів різної локалізації в динаміці після відтворення ЕАЕ та виявлення змін активності катепсину D при даній патології.

Матеріали та методи дослідження

В експерименті використовували білих мишей-самців масою 18–20 г, що утримувалися у стандартних умовах віварію з постійним доступом до води. Для індукції ЕАЕ мишам ін'єктували 50%-й гомо-

генат гомологічного мозку з таким же об'ємом повного ад'юванту Фрейнда у задні лапи під апоневроз [4].

Макрофаги виділяли за методом [5].

Інтенсивність фагоцитозу оцінювали за кількістю клітин дріжджів, поглинутих 10^6 макрофагами [6].

Стан окисно-відновних систем макрофагів оцінювали за кількістю відновленого ними до диформазану нітросинього тетразолію (НСТ-тест) [7].

Активність катепсину D вимірювалась у макрофагах (мікрограмів тирозину на 10^6 клітин) і гомогенатах мозку та печінки (мікрограмів тирозину на міліграм білка) за методом [8]. Вміст білка визначали за методом Лоурі [9].

Результати дослідження та їх обговорення

Дослідження проводили на 3-тю, 7-му та 14-ту добу після введення енцефалітогенної емульсії мишам. У роботі вивчали фагоцитарну активність та здатність відновлювати НСТ макрофагів, вилучених із черевної порожнини та селезінки. У цих клітинах, а також гомогенатах мозку і печінки визначали активність катепсину D. Одночасно оцінювали гістологічні зміни в головному мозку експериментальних тварин.

Порівняння властивостей порожнинних і тканинних макрофагів свідчить про те, що перитонеальні клітини значно перевищують селезінкові за інтенсивністю фагоцитозу та окисно-відновних реакцій (таблиця). Поглинальна здатність макрофагів, вилучених із черевної порожнини, у 4 рази більша, ніж у клітин, отриманих із селезінки. Активність вільних фагоцитів у НСТ-тесті вища у 2,3 рази порівняно з фіксованими. Гетерогенність макрофагів виявлена і при визначенні в них активності катепсину D. Перитонеальні клітини поступаються селезінковим за активністю даного ферменту у 2,6 рази. Тканини печінки і головного мозку не відрізняються одна від одної за активністю цієї протеїнази при розрахунку на міліграм білка.

У тварин з ЕАЕ порівняно з контрольними мишами інтенсивність фагоцитозу макрофагів черевної порожнини та макрофагів селезінки на 3-тю добу становить 34,4 і 54,8 % відповідно (рис. 1, а). Таке зниження активності, очевидно, пов'язане з переважанням організму чужорідними антигенами. Через тиждень поглинальна здатність обох видів макрофагів підвищувалася, але нерівномірно. Якщо в перитонеальних клітинах вона перебувала на рівні 75,3 % від контрольного значення, то в

селезінкових — майже на 50 % перевершувала його. На 14-ту добу ці показники знову знижувалися і становили 64,8 та 66,4 % відповідно.

Динаміка змін активності окисно-відновних процесів у цих клітинах відповідає динаміці змін поглинальної здатності (рис. 1, б). Але кількісні показники відрізняються від контрольного рівня дещо менше. Виняток становить лише ступінь зростання активності перитонеальних макрофагів на 7-му добу: інтенсивність відновлення НСТ у цьому разі перевершує контроль на 25 %.

Таке зростання активності фагоцитів пов'язане з поступовим розвитком запального процесу в ЦНС, що підтверджується морфологічними дослідженнями. Так, у гістологічних препаратах мозку мишей, хворих на ЕАЕ, на 3-тю добу були виявлені помірно виражені порушення кровообігу судин головного мозку (нерівномірне повнокров'я, стаз). Через 7 днів, крім гемодинамічних розладів судин, спостерігалися периваскулярний набряк і запальний периваскулярний круглоклітинний інфільтрат. На 14-ту добу виявлено зростання гемодинамічних порушень, посилення набряку та ступеня периваскулярної круглоклітинної інфільтрації. Ця картина відповідає гістологічним змінам у головному мозку людей з демієлінізуючими процесами, які характеризуються наявністю периваскулярного запального інфільтрату, потоншенням мієлінового шару, наявністю мононуклеарних клітин й активних астроцитів у білій речовині [10; 11].

Активність катепсину D у головному мозку через три доби після введення енцефалітогенної емульсії знижена на 17 % відносно контрольного рівня, а потім, у міру розвитку запального процесу, поступово зростає і стає підвищеною на 7-му та 14-ту добу на 27 і 34 % відповідно (рис. 2).

Таблиця

Показники функціонального стану макрофагів і активність катепсину D у контрольних тварин, $M \pm m$; $n=6-8$

Показники	Фагоцитарна активність, $\times 10^6$, дріжджів на 10^6 макрофагів	Інтенсивність НСТ-тесту, мкг диформазану на 10^6 макрофагів	Активність катепсину D, мкг тирозину на 10^6 макрофагів, мг білка
Перитонеальні макрофаги	$27,49 \pm 2,97$	$69,92 \pm 2,02$	$43,70 \pm 1,36$
Макрофаги селезінки	$7,14 \pm 0,57^*$	$29,76 \pm 2,40^*$	$115,50 \pm 2,49^*$
Печінка	—	—	$21,14 \pm 1,66$
Головний мозок	—	—	$26,57 \pm 1,19$

Примітка. * — різниця вірогідна ($P < 0,05$) порівняно з перитонеальними макрофагами.

Зіставлення з гістологічними змінами свідчить, що зростання протеїназної активності корелює з інтенсивністю мононуклеарної інфільтрації і дає змогу розглядати моноцити/макрофаги як основне джерело катепсину D в ураженому мозку. Активність цього протеолітичного ферменту змінюється також поза межами ЦНС. У макрофагах черевної порожнини і селезінки динаміка цих змін відповідає динаміці змін функціонального стану. В цих клітинах спостерігається зниження активності катепсину D на 3-тю і 14-ту добу та її підвищення, порівняно з контролем, через тиждень після індукції ЕАЕ. Зміни активності цієї протеїнази у печінці виражені навіть більше, ніж у головному мозку: на 3-тю добу вона зростає на 40 %, а через 14 днів — вдвічі.

Підсумовуючи отримані результати, можна відмітити, що за ЕАЕ спостерігаються зміни у функціональному стані макрофагів різної локалізації. Підвищення активності катепсину D, який разом з низкою цитокінів, протаноїдів і біогенних амінів бере участь у формуванні запальної реакції, також відбувається не тільки в органі-мішені. Це свідчить про системний характер захворювання та про необхідність дослідження впливу лікувальних засобів, які використовують за РС, не тільки на ЦНС, а й на стан імунної системи організму та вміст прозапальних компонентів у інших органах. Тому в подальших дослідженнях планується вивчити вплив на ці процеси інтерферону та його індукторів, зокрема тилорону, які успішно використовуються в лікуванні розсіяного склерозу, але механізми дії яких практично не відомі.

Висновки

1. За даними гістологічного дослідження у головному мозку

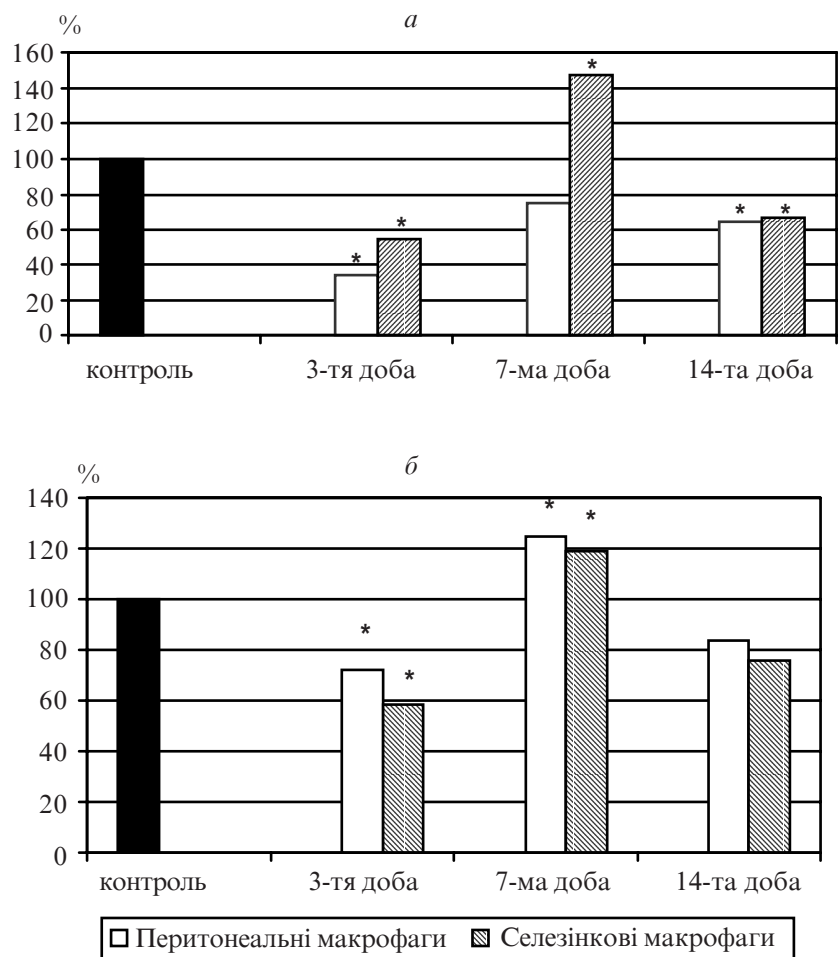


Рис. 1. Зміни функціонального стану макрофагів мишей у динаміці розвитку ЕАЕ: а — фагоцитарна активність; б — інтенсивність НСТ-тесту
Примітка. На рис. 1 і 2: * — різниця вірогідна ($P < 0,05$) порівняно з контролем.

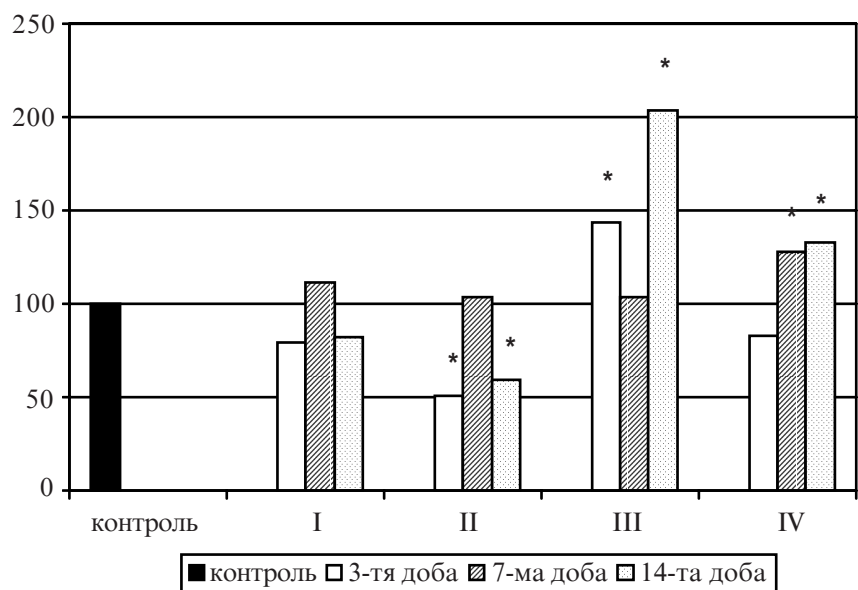


Рис. 2. Активність катепсину D (%) у різних тканинах мишей у динаміці розвитку ЕАЕ: I — перитонеальні макрофаги; II — селезінкові макрофаги; III — печінка; IV — головний мозок

ку мишей за умов моделювання ЕАЕ виявлено наростання запально-деструктивних процесів, яке супроводжується поступовим підвищенням активності катепсину D. Зростання активності цієї протеїнази спостерігається також поза межами ЦНС і є найбільш значним у печінці.

2. Розвиток ЕАЕ у мишей супроводжується накопиченням у периваскулярному просторі головного мозку мононуклеарних клітин і змінами функціонального стану макрофагів іншої локалізації, що свідчить про системну активацію мононуклеарних фагоцитів за умов локального запалення.

3. Виявлено суттєве підвищення на 7-му добу поглинальної здатності, інтенсивності окисно-відновних реакцій та активності катепсину D перитонеальних і селезінкових макрофагів. На 3-тю та 14-ту добу ці показники в обох типах фагоцитів були нижчими за контроль.

Автори висловлюють щиру подяку завідувачу кафедри патологічної анатомії ОДМУ, д-ру мед. наук, проф. А. І. Даниленку за надані гістологічний висновок та консультацію.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Мальшева О. А., Ширинский В. С.* Проблемы и перспективы лечения больных рассеянным склерозом // *Аллергология и иммунология*. — 2002. — № 1. — С. 84-99.

2. *A new cell enzyme-linked immunosorbent assay demonstrates gamma interferon suppression by beta interferon in multiple sclerosis / M. Bakht, C. Withagen, M. Mustafa et al.* // *Clin. and Diagnostic Lab. Immunology*. — 1999. — Vol. 3, N 3. — P. 415-419.

3. *Чекнев С. Б.* Патогенез рассеянного склероза: иммуностимуляция или иммунодефицит? // *Иммунология*. — 1994. — № 2. — С. 9-17.

4. *Короленко Т. А., Свечникова И. Г.* Регуляция цистеиновых протеиназ лизосом клеток печени при стимуляции и депрессии макрофагов // *Вестник РАМН*. — 1998. — № 10. — С. 26-29.

5. *Заргарова Т. А., Фаворова О. О.* Экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит — модель рассеянного склероза // *Иммунология*. — 1999. — № 2. — С. 5-9.

6. *Новые методы культуры животных тканей / Под ред. Ю. М. Оленова.* — М.: Мир, 1976. — 148 с.

7. *Kaminski N. E., Roberts I. F., Guthrie F. E.* A rapid spectrophotometric method for assessing macrophage phagocytic activity // *Immunology Lett.* — 1985. — Vol. 10, N 6. — P. 329-331.

8. *Technique colorimetrique d'evaluation de l'activite phagocytaire des macrophages peritoneaux de souris / D. Raichvarg, E. Marchand, G. Sarfati, J. Agneray* // *Ann. Immunol.* — 1980. — Vol. 131, N 1. — P. 71-78.

9. *Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. Z. Farr, R. J. Randall* // *J. Biol. Chem.* — 1951. — Vol. 193. — P. 265-275.

10. *Inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine are found in monocytes / macrophages and/or astrocytes in acute, but not in chronic, multiple sclerosis / E. Oleszak, E. Zaszynska, M. Bhattacharjee et al.* // *Clin. and Diagn. Lab. Immunol.* — 1998. — Vol. 5, N 4. — P. 438-445.

11. *Острый энцефаломиелит в эксперименте и клинике / Под ред. Д. А. Маркова.* — Минск: Наука и техника, 1969. — 265 с.

УДК 616.832

Т. Ю. Степанова, Т. О. Філіпова, Б. М. Галкін
ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН МАКРОФАГІВ І АКТИВНІСТЬ КАТЕПСИНУ D У МИШЕЙ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ АЛЕРГІЧНИМ ЕНЦЕФАЛОМІЄЛІТОМ

На моделі експериментального алергічного енцефаломієліту вивчена функціональна активність макрофагів і активність катепсину D у цих клітинах, печінці і головному мозку мишей у динаміці розвитку захворювання. За даними гістологічного дослідження виявлено зростання запально-деструктивних процесів у головному мозку, що супроводжується підвищенням активності катепсину D. У динаміці розвитку ЕАЕ активність цієї протеїнази значно зростає також у печінці. Розвиток ЕАЕ супроводжується периваскулярною інфільтрацією мозку мононуклеарними клітинами і змінами функціонального стану макрофагів поза ЦНС.

Ключові слова: експериментальний алергічний енцефаломієліт, макрофаги, катепсин D.

UDC 616.832

T. Yu. Stepanova, T. O. Filipova, B. M. Galkin
FUNCTIONAL STATE OF MACROPHAGES AND CATHEPSIN D ACTIVITY IN MICE WITH EXPERIMENTAL ALLERGIC ENCEPHALOMYELITIS

The functional activity of macrophages, activity of cathepsin D in these cells, liver and cerebrum have been studied in the dynamics on the model of experimental allergic encephalomyelitis. The histological assay has shown an activation of inflammatory and destructive processes in cerebrum. These processes are followed with the increase of cathepsin D activity in cerebrum and liver in the EAE dynamics. The perivascular infiltrations of cerebrum with monocytes and changes in functional state of macrophages out of CNS have been detected.

Key words: experimental allergic encephalomyelitis, macrophages, cathepsin D.