

**Т. М. Бризгіна, Л. І. Алексюк, Т. В. Мартинова,
В. С. Сухіна, І. М. Алексеева**

Вплив блокаторів циклооксигеназного та ліпоксигеназного шляхів метаболізму арахідонової кислоти на імунну відповідь, активність монооксигеназної системи і перекисного окиснення ліпідів у селезінці та печінці мишей

В опытах на мышах линии СВА изучали иммунный ответ (ИО) на эритроциты барана, активность монооксигеназной системы и перекисное окисление липидов (ПОЛ) в селезенке и печени в условиях применения блокаторов циклооксигеназного и липоксигеназного путей окисления арахидоновой кислоты (АК) — индометацина и нордигидрогуаяретовой кислоты (НДГК) соответственно. Установлено, что оба блокатора неоднозначно изменяют интенсивность иммунного ответа в разные фазы его развития. В индуктивную фазу и фазу затухания иммунного ответа индометацин и НДГК дозозависимо стимулируют накопление антителообразующих клеток в селезенке мышей. В продуктивную фазу эти изменения выражены в меньшей степени, а в случае использования НДГК в зависимости от дозы имеют разную направленность: меньшая доза стимулирует иммунный ответ, большая незначительно угнетает. Изменения активности монооксигеназной системы в селезенке и печени под влиянием обоих блокаторов независимо от дозы разнонаправлены: при действии индометацина наблюдается ее повышение, при действии НДГК — снижение во все сроки исследования за исключением 5-х суток (продуктивная фаза иммунного ответа). В этих условиях изменения активности ПОЛ в селезенке и печени имели противоположную направленность по отношению к изменениям активности монооксигеназной системы.

Вступ

Арахідонова кислота (АК) займає одне з провідних місць серед речовин біогенного походження, котрі регулюють активність біологічних систем. Вона може за участю циклооксигенази або ліпоксигенази окиснюватися двома способами, що призводить до генерації різних типів біологічно активних молекул-медіаторів, таких як простагландини (ПГ), лейкотриєни (ЛТ) тощо [10]. Дослідження низки авторів [13, 18], присвячені ролі ПГ в імунних реакціях, свідчать про те, що вони являють собою міжклітинні медіатори, синтезуються переважно макрофагами, а також Т- і В-клітинами. Найбільш активними в імунних реакціях є простагландини групи Е (ПГЕ). Виявлено, що ПГЕ впливають на процеси проліферації поліпотентної стовбурової кровоутворюючої клітини, відіграють певну роль у контролюванні імунних реакцій на Т-залежні антигени, беруть участь в антитілоутворенні [5, 12]. Встановлено, що лейкоцити є не тільки джерелом утворення ЛТ В₄, але й

© Т. М. Бризгіна та ін.

сприяють його метаболізму. ЛТ В4 дозозалежно знижує здатність стимульованих фітогемаглютиніном лімфоцитів людини генерувати фактор гальмування міграції, а також помірно пригнічувати здатність до бласттрансформації [4, 17].

Є дані про складні взаємозв'язки імунної реакції організму й активності ферментної монооксигеназної системи клітин, як імунокомпетентних, так і печінкових. В останніх монооксигеназна система найбільш розвинена. Високореакційні продукти метаболізму ксенобіотиків можуть кон'югувати з молекулами білків і ставати імуногенними, викликаючи імунну відповідь [7]. З іншого боку, можлива токсична дія цих метаболітів на імунокомпетентні клітини [9]. Функціонування ферментної монооксигеназної системи та імунної знаходиться у тісному зв'язку з процесами перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), які ініціюються реакційними метаболітами ксенобіотиків, та, в свою чергу, впливають на монооксигеназну систему та на процеси, що забезпечують імуногенез [2].

Дані літератури про участь ПГ і ЛТ у формуванні гуморальної імунної відповіді нечисленні та суперечливі, а про вплив цих метаболітів АК на супутні біохімічні процеси (активність монооксигеназної системи та ПОЛ) в імунокомпетентних органах і в печінці в динаміці розвитку імунної відповіді — майже відсутні.

Метою нашої роботи було вивчення впливу блокаторів циклооксигеназного та ліпоксигеназного шляхів метаболізму АК на розвиток імунної відповіді мишей на гетероантиген — еритроцити барана (ЕБ), активність монооксигеназної системи та ПОЛ у селезінці та печінці мишей.

Методика

Досліди проведено на 225 мишах лінії СВА обох статей, масою 18–23 г. ЕБ вводили в дозі $2,5 \cdot 10^8$ клітин, одноразово, внутрішньовенно. Для блокади циклооксигеназного способу окиснення АК застосовували індометацин; (фірма «Sigma», США) в дозах 0,25 і 5 мг/кг [1], для блокади ліпоксигеназного шляху — нордигідроугаяретову кислоту (НДГК; фірма «Sigma», США) в дозах 0,25 та 30 мг/кг [15, 16]. Блокатори вводили внутрішньоочередово кожної доби протягом 3 діб, останнє введення поєднували з ін'єкцією ЕБ. У контрольній групі тварин замість блокаторів вводили фізіологічний розчин (0,5 мл на тварину). Дослідження проводили через 1, 5 і 14 діб після введення ЕБ. У мишей визначали кількість АУК у селезінці за методом Jerne та Nordina [14]. Монооксигеназну активність визначали у мікросомальній фракції печінки, яку одержували методом диференційного центрифугування, та гомогенатах селезінки за показниками швидкості N-деметилування амінопіріну [3, 6]. Активність ПОЛ вивчали у мікросомальній фракції печінки та спленоцитах, вилучених у градієнті щільності фікол-верографін (1,078), за методом індукованої хемілюмінесценції на хемілюмінометрі ХЛМ-1, який з'єднаний з комп'ютером. Рівень активності ПОЛ оцінювали за загально визнаними показниками, що характеризують кінетику вільнорадикальних процесів при індукованій Fe^{2+} та H_2O_2 хемілюмінесценції [8, 11].

Статистичну обробку результатів проводили методом різниць за допомогою критерію *t* Стьюдента.

Результати та їх обговорення

Встановлено, що блокатор циклооксигеназного шляху метаболізму АК — індометацин впливає на інтенсивність імунної відповіді під час її розвитку. Так, уже в індуктивну фазу імунної відповіді (1-ша доба після введення ЕБ) при використанні як меншої (0,25 мг/кг), так і більшої (5 мг/кг) дози визначалася стимуляція антитілоутворення — кількість АУК у селезінці тварин перевищувала контрольне значення (ЕБ) на 84 і 107 % відповідно (табл. 1). Спостерігалось значне підвищення монооксигеназної активності в селезінці (на 75 і 85 % при дозі 0,25 і 5 мг/кг відповідно) і в печінці (на 53 і 76 % відповідно) (рис. 1). Щодо ПОЛ, то застосування меншої дози індометацину не впливало на рівень його активності в селезінці, а більша доза дещо її стимулювала. Це проявлялось у збільшенні на 39 % загальної світлосуми — інтегрального показника, що характеризує накопичення перекисних продуктів за умов максимальної стимуляції ПОЛ. Активність ПОЛ у печінці, на відміну від селезінки, практично не змінювалася у разі використання великої дози та дещо підвищувалася при застосуванні меншої дози (загальна світлосума збільшувалася на 20 % відносно контролю, див. рис. 1).

У продуктивну фазу імунної відповіді (5-та доба досліджень) не спостерігалось значного збільшення інтенсивності імунної відповіді: кількість АУК у селезінці при використанні дози 0,25 мг/кг практично не відрізнялася від контролю, а застосування більшої дози призводило до підвищення контрольного значення лише на 20 %). У цей період активність монооксигеназної системи у селезінці та в печінці знижувалася порівняно з першою добою досліджень, але залишалася вищою за контрольне значення, особливо в печінці при застосуванні більшої дози індометацину. Рівень активності ПОЛ у селезінці значно не відрізнявся від такого у попередній строк дослідження та залишався підвищеним відносно контролю, а в печінці — навпаки знижувався, особливо в разі застосування більшої дози блокатора (загальна світлосума була на 13 % нижчою за контрольну у цей час, див. рис. 1).

Застосування обох доз індометацину у фазу затухання імунної відповіді (14-та доба) призводить до збільшення кількості АУК у селезінці (на 60 і

Таблиця 1. Зміни вмісту антитілоутворюючих клітин у селезінці після введення еритроцитів барана інтактним мишам та при застосуванні індометацину

Групи тварин	1-ша доба	5-та доба	14-та доба
Миші, які отримували еритроцити барана	135±46	15289±1147	254±40
еритроцити барана та індометацин			
0,25 мг/кг	249±3*	16048±2301	407±94
5,0 мг/кг	303±94	18323±2241	700±292

* $P < 0,05$ (тут і в табл. 2).

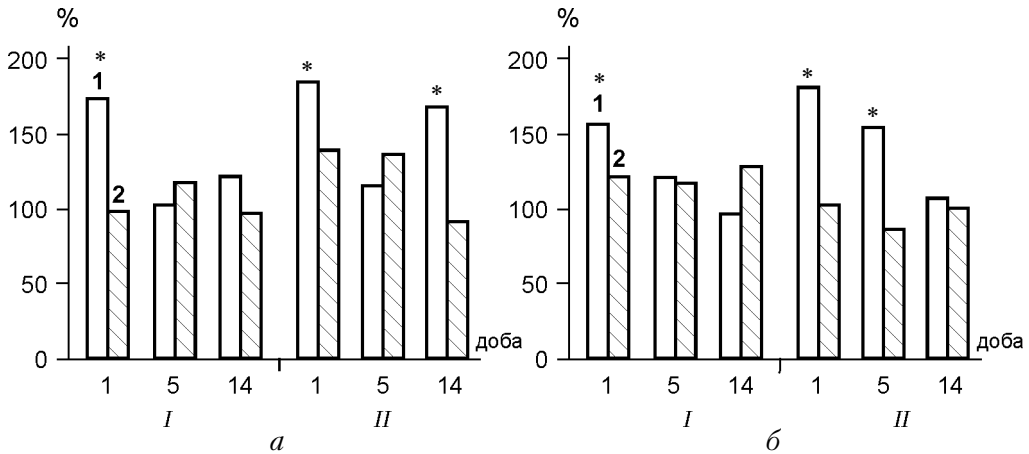


Рис. 1. Вплив індометацину (I – 0, 25 мг/кг, II – 5, 0 мг/кг) на активність монооксигеназної системи (1 – швидкість N-деметилування амінопіріну) та ПОЛ (2 – загальна світлосума) в селезінці (а) та печінці (б) мишей за умов розвитку імунної відповіді на еритроцити барана.

176 % у разі використання меншої та більшої доз відповідно порівняно з контролем). У цей період не виявлялося виражених змін активності монооксигеназної системи та ПОЛ в селезінці і у печінці, значення їх показників наближалися до контрольних.

За умов блокади ліпоксигеназного шляху окиснення АК за допомогою НДГК спостерігалася стимуляція імунної відповіді майже в усі строки досліджень у разі застосування обох доз блокатора (табл. 2). Виключенням була лише продуктивна фаза імунної відповіді (5-та доба досліджень) у разі застосування більшої дози (30 мг/кг), коли визначалося пригнічення імунної відповіді (кількість накопичених у селезінці АУК знижувалася на 27 % відносно контролю).

За цих умов, на відміну від дії індометацину, активність монооксигеназної системи в селезінці в індуктивну і фазу затухання імунної відповіді була пригніченою, особливо в індуктивну фазу – на 34 % у разі застосування меншої дози та на 24 % – більшої дози НДГК, а в продуктивну фазу, вірогідно підвищувалося при використанні обох доз блокатора.

Таблиця 2. Зміни вмісту антитілоутворюючих клітин у селезінці після введення еритроцитів барана інтактним мишам та при застосуванні нордигідрогуаяретової кислоти (НДГК)

Групи тварин	1-ша доба	5-та доба	14-та доба
Миші, які отримували			
еритоцити барана	25±7	20781±1314	73±15
еритоцити барана та НДГК			
0,25 мг/кг	126±24*	25925±1434*	87±7
30,0 мг/кг	46±17	15191±1879	209±38*

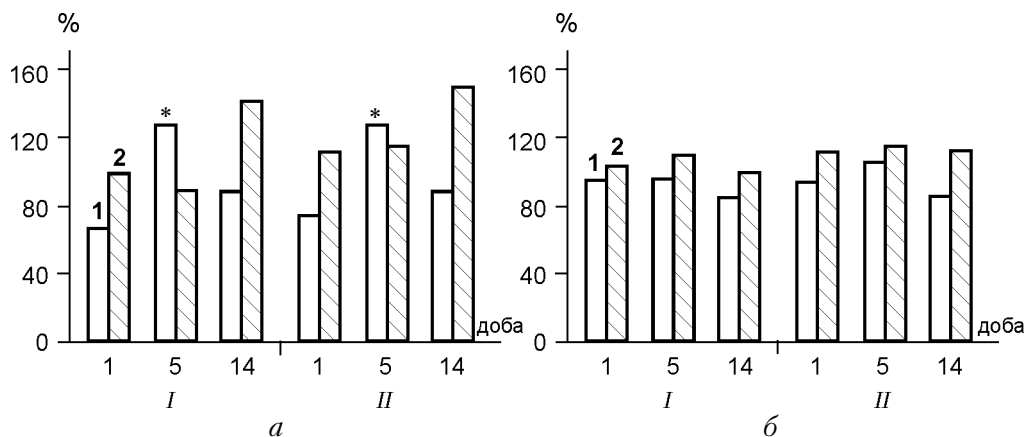


Рис. 2. Вплив нордигідрогуаяретової кислоти (I – 0, 25 мг/кг, II – 30, 0 мг/кг) на активність монооксигеназної системи (1 – швидкість N-деметиловання амінопіріну) та ПОЛ (2 – загальна світлосума) в селезінці (а) та печінці (б) мишей за умов розвитку імунної відповіді на еритроцити барана.

Введення НДГК не виявляло значного впливу на зміни активності монооксигеназної системи в печінці. На відміну від дії індометацину, її активність в усі строки досліджень визначалася дещо пригніченою (на 18 % – фаза індукції – 1-ша доба, на 14 % – фаза затухання імунної відповіді – 14-та доба), або на рівні контрольних значень (продуктивна фаза – 5-та доба, рис. 2). Щодо ПОЛ, то в печінці незначне підвищення рівня активності у разі використання дози НДГК 0,25 мг/кг реєструвалося лише в продуктивну фазу імунної відповіді (загальна світлосума перевищувала контрольне значення на 13 %, див. рис. 2), а в інші фази – практично не відрізнялася від контролю. Застосування більшої дози (30 мг/кг) – стимулювало активність ПОЛ в індуктивну та продуктивну фази імунної відповіді. Однак ці зміни не були вірогідні. В селезінці вони мали таку саму направленість і вираженість, що і в печінці, окрім фази затухання, де реєструвалася значна стимуляція ПОЛ у разі застосування обох доз блокатора (загальна світлосума перевищувала контроль на 41 і на 51 % при дозі 0,25 і 30 мг/кг відповідно).

Проведені дослідження засвідчили, що блокада циклооксигеназного та ліпоксигеназного шляхів метаболізму АК відображається на інтенсивності імунної відповіді мишей на гетероантиген у різні фази її розвитку і супроводжується змінами активності монооксигеназної системи та ПОЛ у селезінці і печінці. Вплив обох блокаторів на імунну відповідь у різні фази її розвитку виявився неоднозначним. В індуктивну фазу імунної відповіді і фазу її затухання ІНД і НДГК дозозалежно стимулюють накопичення антитілотворюючих клітин у селезінці. У продуктивну фазу ці зміни виражені значно менше, а в разі застосування НДГК залежно від дози мають різну спрямованість: менша доза стимулює імунну відповідь, а більша – пригнічує. Зміни активності монооксигеназної системи в селезінці і печінці під впливом ІНД і НДГК мають протилежну направленість: при дії ІНД активність підвищується, при дії НДГК – знижується майже в усі строки

досліджень, за виключенням 5-ї доби (продуктивна фаза імунної відповіді). За цих умов спостерігали фазні зміни активності ПОЛ в селезінці та печінці, що знаходились у протилежному зв'язку зі змінами активності монооксигеназної системи. Таким чином, є підстави вважати, що продукти метаболізму АК модулюють як гуморальну імунну відповідь на рівні утворення антитілоутворюючих клітин у селезінці, так і активність ПОЛ і монооксигеназної системи в імунокомпетентних і печінкових клітинах. Ефекти дії продуктів метаболізму АК за циклооксигеназним і ліпоксигеназним шляхами мають свої особливості.

Робота фінансована Державним фондом фундаментальних досліджень.

**T. M. Bryzgina, L. I. Aleksyuk, T. V. Martinova,
V. S. Sukhina, I. N. Alexeyeva**

**THE EFFECTS OF INHIBITORS OF CYCLOOXYGENASE
AND LYPOXYGENASE PATHWAYS OF OXYDATION
OF ARACHIDONIC ACID ON THE IMMUNE RESPONSE,
AND THE ACTIVITY OF MONOOXYGENASE SYSTEM
AND LIPID PEROXIDATION IN MICE**

In experiments on CBA mice we studied an immune response (IR) to sheep red blood cells, the activity of monooxygenase system and lipid peroxidation (LP) in a spleen and a liver after administration of indomethacin (IND) and nordihydroguaiaretic acid (NDGA) as the inhibitors of cyclooxygenase and lipoxygenase pathways of oxydation of arachidonic acid consequently. We have found that the both inhibitors changed differently the intensity of IR during its development. IND and NDGA activate the accumulation of antibody-forming cells in the mouse spleen in a dose-dependent fashion at both the inductive and fading phases of IR. At the productive phase these changes are less expressed and they are different depending on the dose of NDGA: the smaller dose increases the immune response and the bigger one decreases it a bit. Changes in the activity of the monooxygenase system in spleen and liver, affected with the both inhibitors, independing on the dose, were of different direction: after IND administration the activity increased, but after NDGA administration it decreased at all the terms of investigation, excluding the term of the 5-th day (productive phase of IR). In these conditions changes in the activity of IR were of opposite direction as compared to the changes in the monooxygenase system.

*A. A. Bogomoletz Institute of Physiology,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Александрова Г. М., Рожкова В. Н., Борисова Л. Н. Сравнительная характеристика иммунотропной активности натрия диклофенака, индометацина и натрия салицилата // Фармакология и токсикология. — 1981. — №4. — С.450-453.
2. Алексеева І. М., Бризгіна Т. М., Алексюк Л.І. та ін. Імунна відповідь мишей на еритроцити барана, активність монооксигеназної системи і перекисне окислення ліпідів у селезінці, тимусі і печінці в нормі та при застосуванні чотиріхлористого вуглецю // Доп. НАН України. — 1998. — № 1. — С.186-189.

3. Арчаков А. И. Микросомальное окисление. — М.: Наука, 1975. — 327 с.
4. Беклемишев Н. Д. Роль лейкотриенов в иммунитете и иммунорегуляции // Иммунология. — 1989. — № 4. — С.14-18.
5. Громыхина Н.Ю., Козлов В. А. Простагландины как фактор регуляции гуморального иммунного ответа // Там же. — 1982. — № 5. — С.11-15.
6. Карузина И. И., Арчаков А. И. Современные методы в биохимии. — М.: Медицина, 1977. — С.49-62.
7. Ковалев И. Е., Полевая О.Ю. Биохимические основы иммунитета к низкомолекулярным химическим соединениям. — М.: Наука, 1985. — 302 с.
8. Лопухин Ю. М., Молоденков М. И., Владимиров Ю. В. Регистрация хемилюминесценции составных частей сыворотки крови в присутствии двухвалентного железа // Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 1985. — №2. — С.61-63.
9. Лукьянова Л. Д., Балмуханов Б. П., Уголев Х. Г. Кислородзависимые процессы в клетке и ее функциональное состояние. — М.: Наука, 1982. — 300 с.
10. Пархомец В. П., Донченко Г. В. Метаболизм арахидоновой кислоты и витамина Е // Укр. биохим. журн. — 1992. — **64**, № 6. — С.3-11.
11. Серкиз Я. И., Чеботарев Е. Е., Барабой В. А. Хемилюминесцентное исследование крови в экспериментальной и клинической онкологии. — К.: Наук.думка, 1984. — 184 с.
12. Chouaib S., Welte K., Mertelsmann R., Dupont B. Prostaglandin E2 acts at two distinct pathways of T lymphocyte activation: inhibition of interleukin 2 production and down-regulation of transferrin receptor expression // J. Immunol. — 1985. — **135**, №2. — P.1172-1179.
13. Goodwin J., Bromberg S., Staszak C. et al. Effect of physical stress on sensitivity of lymphocytes to unhibition by prostaglandin E2 // Ibid. — 1981. — **127**, №2. — P.518-522.
14. Jerne K., Nordin A. Plaque formation in agar by single antibody -producing cells // Science. — 1963. — **140**, №2. — P.405-408.
15. Madrigal-Bujaidar E., Diaz Barriga S., Cassani M. et al. In vivo and in vitro induction of sister — chromatid exchanges by nordihydroguaiaretic acid // Mutat. Res. — 1998. — **412**, №2. — P.139-144.
16. Perez-Alvarez V., Bobadilla-Lugo R., Muriel P. et al. Effects of leukotriene synthesis inhibition on acute liver damage induced by carbon tetrachloride // Pharmacology. — 1993. — **47**, №9. — P.330-336.
17. Rola-Pleszynski M. Differential effects of leukotriene B4 on T4+ and T8+ lymphocyte phenotype and immunoregulatory functions // J. Immunol. — 1985. — **135**, №2. — P.1357-1360.
18. Stenson W., Parker C. Prostaglandins, macrophages and immunity // Ibid. — 1980. — **125**, №1. — P.1-5.

Ин-т фізіології ім. О. О. Богомольця
НАН України, Київ

Матеріал надійшов
до редакції 21.04.2000