

УДК 615.036.8

ВПЛИВ α -ЛІПОЄВОЇ КИСЛОТИ НА ФУНКЦІОНАЛЬНУ АКТИВНІСТЬ ФАГОЦИТІВ

Ю. В. ЮЗВЕНКО¹, Л. М. ЯРЕМЕНКО²

¹Національний авіаційний університет, м. Київ

²Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ

У роботі, на прикладі препарату берлітійон, досліджено вплив антиоксидантів на фактори природної резистентності організму. Виявлено вплив α -ліпоєвої кислоти на характеристики клітинної ланки імунітету, а також, на модулювання фагоцитарної та бактерицидної активності клітин крові щурів.

Ключові слова: імунітет, гомеостаз, патогенні бактерії, антиоксиданти, фактори природної резистентності, фагоцитоз, метаболічна активність клітин, α -ліпоєва кислота, препарат берлітійон.

Вступ. Імунна система є головною для забезпечення сталості гомеостазу організму. Немає жодного запально-патологічного процесу, який би не був пов'язаний зі станом імунітету.

Людина і тварина постійно контактують з багатьма мікроорганізмами – бактеріями, вірусами, грибами, найпростішими. Частина мікробів мешкає в організмі і становить нормальну мікробіоту, яка виконує важливі захисні функції. Представники нормальної мікробіоти (стафілококи, мікрококи, стрептококи, сарцини, молочнокислі бактерії, бацили) перешкоджають проникненню багатьох патогенних мікроорганізмів, завдяки колонізаційній резистентності, зумовленій конкуренцією у боротьбі за поживні речовини і ніші проживання, блокадою специфічних для патогенів рецепторів, виділенням

різних бактерицидних і бактеріостатичних продуктів життєдіяльності – антибіотиків, бактеріоцинів, ендотоксинів, ферментів, кислот.

При високій вірулентності мікроорганізмів, набутій або вродженій недостатності системи природної резистентності організм не може самостійно елімінувати патоген [12].

Для профілактики частих захворювань призначається застосування вітамінів та антиоксидантів, що виконують імуномодельюючу роль та покращують метаболічні процеси в організмі [3].

Природний захист організму забезпечують: зовнішні покриви (шкіра, слизові оболонки), клітинні (фагоцитуючі клітини, клітини природної цитотоксичності) та гуморальні фактори [10].

Для вибору оптимальних методів лікування, контролю ефективності лікувальних заходів, підбору способів профілактики ряду захворювань, а також вивчення впливу на організм різних факторів, у тому числі лікарських препаратів, проводиться оцінка стану природної резистентності організму, яка заснована на визначенні рівня активності неспецифічних (клітинних і гуморальних) чинників захисту [2].

Для профілактики частих захворювань призначається застосування вітамінів та антиоксидантів, що виконують імуномодельюючу роль та покращують метаболічні процеси в організмі [3].

Метою роботи було вивчити фагоцитарну активність лейкоцитів периферичної крові щурів при застосуванні антиоксидантів.

Застосування антиоксидантів – інгібіторів вільнорадикальних процесів є невід’ємним компонентом комплексної терапії при запальних процесах. Для лікування на різних етапах патологічного процесу застосовують такі препарати: вітамін Е, кверцитин, рутин, α -ліпоєва кислота та інші. Проведення такої терапії лежить в основі попередження утворення вільних радикалів та знижує концентрацію продуктів перекисного окислення ліпідів, підвищує ефективність енергетичного метаболізму та життєздатність нервових клітин в умовах ішемії [4].

Застосування вітамінів та антиоксидантів при патологічних процесах відіграє імуномодельюючу роль та покращує метаболічні процеси в організмі [3]. Важливо відмітити антиоксидантний ефект берлітіону, механізм дії якого оснований на безпосередній інактивуваці вільних радикалів. Разом з тим, він є донором SH-групи, стабілізує функції глутамат-іон-залежної антиоксидантної системи захисту організму [1, 16, 17]. Встановлено, що α -ліпоєва кислота здатна проникати через гематоенцефалічний бар'єр (ГЕБ), пригнічувати демієлінізацію та аксональне пошкодження головного мозку [19, 22, 23]. Одним із механізмів фармакологічної дії α -ліпоєвої кислоти є інгібування активності матриксної металопротеїнази-9, що сприяє поліпшенню функції ГЕБ, зниженню її проникності і тим самим пригніченню запалення, розвитку демієлінізації та аксональної дегенерації ЦНС [21]. Препарат виявляє також нейропротекторний ефект відносно ЦНС [19, 23], підвищує стійкість до гіпоксії та проявляє протиішемічну активність [18, 24]. Під впливом берлітіону відмічається покращення периферичного кровообігу, в тому числі і нервової тканини. Отже, застосування α -ліпоєвої кислоти може мати позитивний ефект при підтримці гомеостазу організму та попередженні виникнення патологічних процесів.

Матеріали та методи досліджень. Дослідження проведені на 50 білих статевозрілих щурах лінії Вістар вагою 260–290 г, які утримувалися на стандартному раціоні у віварії Національного медичного університету імені О. О. Богомольця. В досліджах використовували тільки самців щурів, оскільки рівень естрогенів впливає на протікання патологічного процесу [20].

Термін спостереження становив 1, 3, 10, 30 діб у різних серіях експерименту. Тварини були поділені на 2 групи: 1 – інтакні ($n = 10$); 2 – тварини, які отримували лікування препаратом берлітіон фірми Berlin Chemie ($n = 10$ на кожну серію експерименту). Препарат вводили підшкірно (20 мг/кг) 0,2 мл берлітіону + 0,8 мл фізіологічного розчину упродовж 10 днів.

Забір крові з пахової вени щурів (3–5 мл) проводили у сухі хімічно чисті центрифужні пробірки з додаванням 25 одиниць гепарину на 1 мл крові. Для

цього тваринам вводили надмірну кількість тіопенталу натрію у дозі 200 мг/кг. Після того, як тварина заснула, гострими ножицями розрізали шкіру в області паху задньої кінцівки, шкіру відсепаровували, знаходили пахову вену, перерізали її та збирали кров [1].

Визначення фагоцитарної активності лейкоцитів периферичної крові здійснювали мікроскопічним методом.

Фагоцитарна активність нейтрофілів вивчалась на підставі визначення відсотку фагоцитуючих клітин та фагоцитарного числа (поглинальна здатність); як об'єкт фагоцитозу використовували добову вбиту культуру *Staphylococcus aureus* штам 209, культура отримана з музею кафедри мікробіології Національного медичного університету ім. О. О. Богомольця [12].

У відалівські пробірки з 0,1 мл 1 % розчину лимоннокислого натрію додавали 0,2 мл гепаринізованої крові та 0,1 мл 400 млн суспензії золотистого стафілококу за методом Г. Фримель. Суміш ретельно перемішували і інкубували в термостаті за температури 37 °С упродовж 30 хв. Після інкубації суміш центрифугували 3 хв. при 1000 об/хв., потім обережно відбирали верхній шар, представлений переважно фагоцитуючими клітинами, з яких готували препарати, фіксували в суміші Нікіфорова, фарбували за Романовським-Гімза. Облік проводили наступним чином: підраховували відсоток фагоцитуючих клітин (фагоцитарна активність) і кількість поглинутих бактерій клітиною (поглинальна здібність) – мікробне число на 200 фагоцитарних клітин лейкоцитів [12].

Бактерицидна активність сироватки крові – здатність до знищення патогенних бактерій, що обумовлена дією гуморальних факторів неспецифічної резистентності (лізоциму, лактоферину, комплементу) і нормальних антитіл [15]. Визначення бактерицидності нейтрофілів проводили за допомогою тесту відновлення тетразолія нітросинього (НСТ-тест).

Метаболічну активність фагоцитів досліджували за допомогою тесту з нітросинім тетрозолієм (НСТ-тест) [12]. Проводили визначення середнього цитотоксичного коефіцієнту (СЦК) [8].

Предметом дослідження були фагоцитуючі клітини периферичної крові. Метаболічну активність оцінювали за рівнем відновлення нейтрального тетразолію з подальшим обліком відсотку клітин, що включають гранули формазану та середнього цитохімічного коефіцієнту щільності цих гранул. Периферичну кров відбирали з пахової вени дослідних груп тварин. У віддалевські пробірки вносили по 0,1 мл гепаренізованої крові і, звільнившись від суміші еритроцитів розчином NH_4Cl , додавали 0,05 мл фосфатного буфера і 0,05 мл 0,2 % розчину тетразолію нітросинього. Інкубували за температури 37°C упродовж 20–30 хв. Пробірки струшували, охолоджували до кімнатної температури. Потім готували мазки, після висушування їх фіксували метанолом упродовж 5 хв., промивали дистильованою водою та фарбували 0,5 % розчином нейтрального-червоного упродовж 120 хв. Після фарбування мазки висушували та підраховували кількість диформазапозитивних клітин [6].

Визначали відсоток нейтрофілів, які містять більше 2-х гранул диформазапу. Нормою у тесті відновлення нітросинього тетразолію були показники інтактної групи шурів [7].

Статистична обробка результатів дослідження проводилась на ПК за програмою „Statistica”. Критерії рахували достовірними при $P < 0.05$; 0.01; 0.001 та менше.

Результати та їх обговорення. У крові тварин, які отримували лікування препаратом берлітін, через 1 добу спостерігалось достовірне зниження кількості фагоцитуючих клітин (Фі) (Рис. 1) та їх фагоцитарної активності (Фч) (Рис. 2), у порівнянні із тваринами інтактної групи.

Через три доби після початку введення препарату берлітін спостерігалось значне зниження бактерицидної активності сироватки крові та середнього цитотоксичного коефіцієнта по відношенню до інтактної групи тварин, що може бути пов'язане зі стресовою реакцією на введення препарату та контакту з самою твариною (Рис. 3, 4).

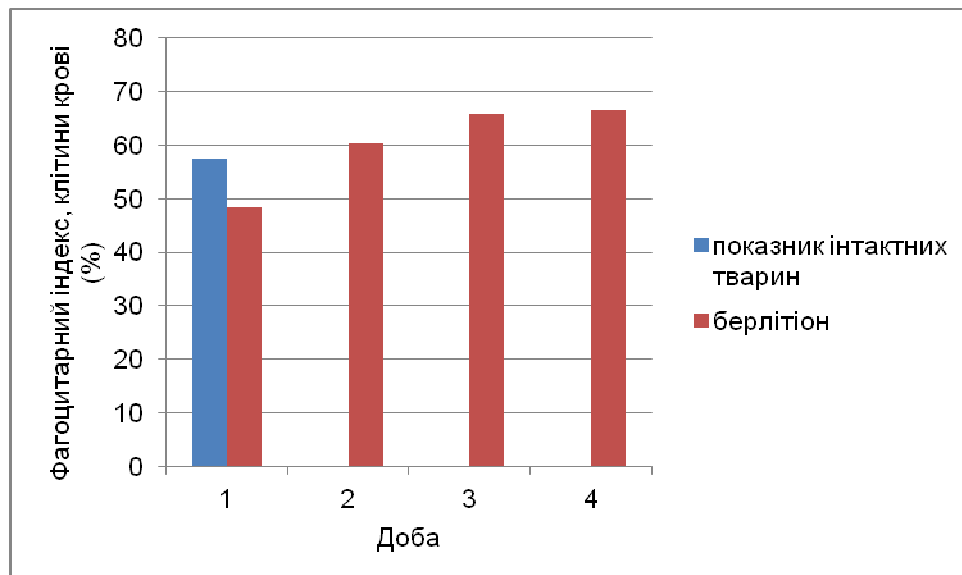


Рис. 1. Вплив берлітiону на фагоцитарний індекс

При визначенні бактерицидної активності фагоцитуючих клітин у щурів, які отримували лікування упродовж 1–3 дiб спостерігається незначне зниження у порівнянні з тваринами інтактноi групи, що обумовлювалось стресовою реакцією організму (Рис. 3, 4).

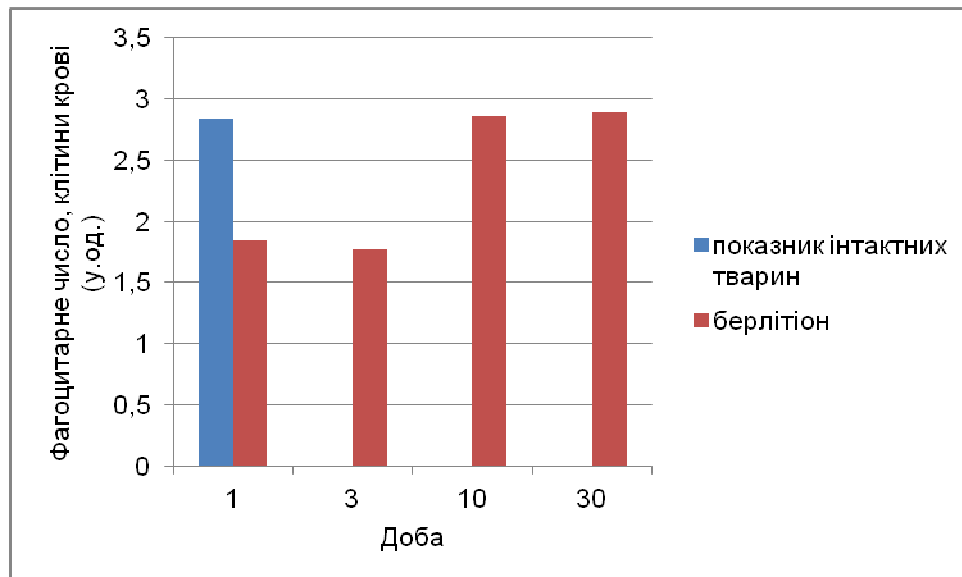


Рис. 2. Вплив берлітiону на фагоцитарне число

Вивчаючи показники природної резистентності у групи тварин які отримували препарат Берлітiон, упродовж 10 дiб, спостерігалось значне зростання Фі та Фч по відношенню до показників тварин інтактних груп (таб. 1). Це можна пояснити звиканням тварин до рук і запаху дослідника, часу прийому препарату , а також стимуляції клітинної ланки імунітету.

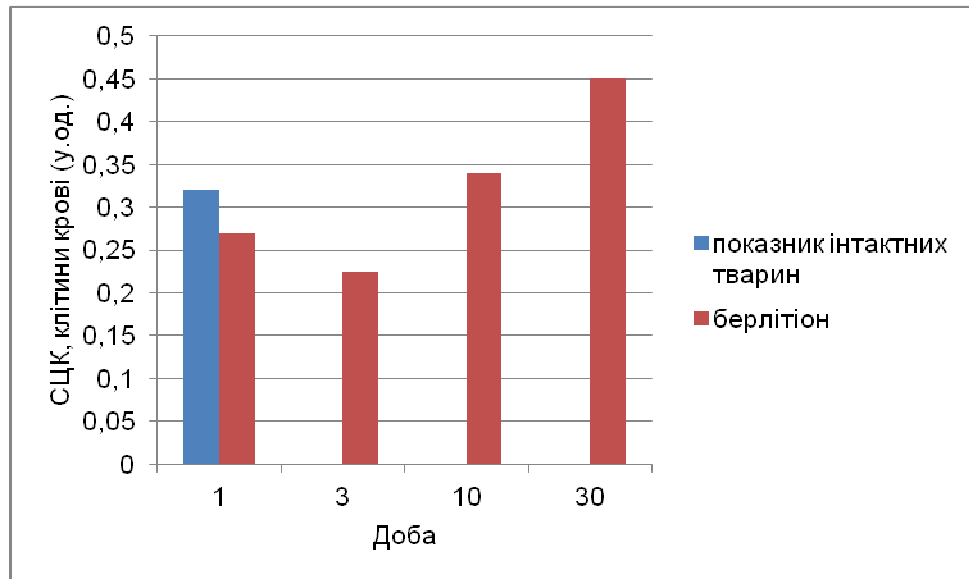


Рис. 3. Вплив берлітiону на СЦК

Показник бактерицидної активності фагоцитуючих клітин та СЦК у групи тварин які отримували антиоксиданти упродовж 10 діб, був дещо підвищеним у порівнянні з інтактною групою тварин (Рис. 3, 4).

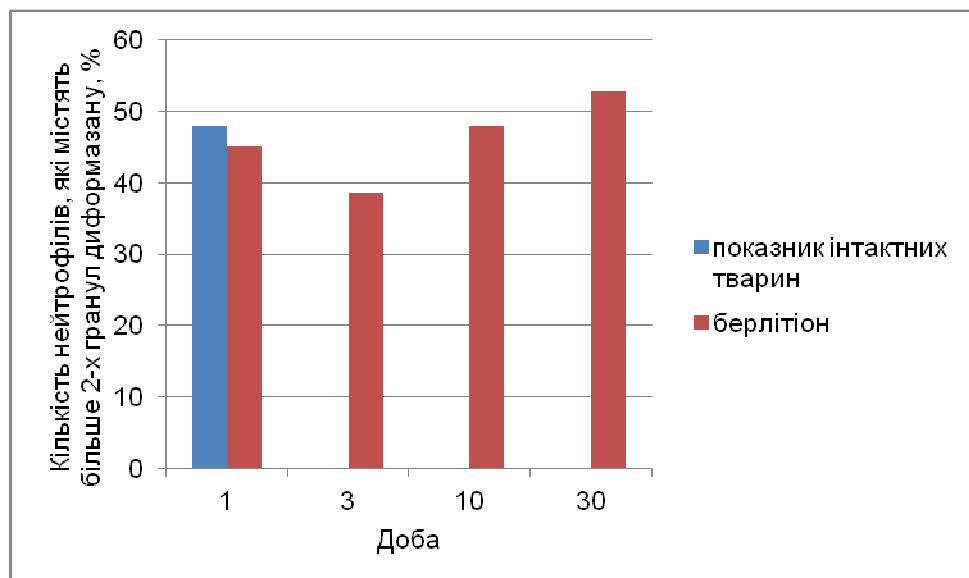


Рис. 4. Вплив берлітiону на бактерицидність нейтрофілів

У віддалені строки експерименту (30 діб) відмічалось зростання як фагоцитарної так і бактерицидної активності в НСТ-тесті та середнього цитохімічного коефіцієнту поліморфноядерних лейкоцитів крові (таб. 1).

Фагоцитарна та бактерицидна активність поліморфоядерних лейкоцитів крові щурів

Показники	Інтактні тварини	Доба	Берлітiон
Фагоцитарний iндекс, клітини крові (%)	57,5±2,02	1	48,5 ± 3,3
		3	60,3 ± 3,6
		10	66,0 ± 3,6
		30	66,7 ± 2,5
Фагоцитарне число, клітини крові	2,84±0,18	1	1,8 ± 0,08
		3	1,8 ± 0,07
		10	2,9 ± 0,07
		30	2,9 ± 0,05
НСТ-тест, клітини крові (%)	48,0±2,47	1	45,2 ± 1,4
		3	38,7 ± 2,0
		10	48,0 ± 3,0
		30	52,8 ± 2,0
Середній цитохімічний коефіцієнт, клітини крові	0,32±0,022	1	0,3 ± 0,01
		3	0,2 ± 0,01
		10	0,3 ± 0,02
		30	0,5 ± 0,01

ВИСНОВКИ

1. Введення тваринам α -ліпоєвої кислоти призводить до покращення як кількісних, так і якісних характеристик клітинної ланки імунітету в ранній період спостереження (10 доба), що попереджає наростання активності гуморальної складової імунної реакції.

2. Застосування α -ліпоєвої кислоти призводить до виразного модулювання фагоцитарної та бактерицидної активності клітин крові щурів, наближаючи, а в деяких випадках і перевищуючи ці показники, до притаманних умовно інтактним тваринам.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Діабетичні нейропатії: Методичні рекомендації / [Сергієчко О. О., Урбанович А. М., Кривко Ю. Я., Кочицький З. Я.] – К.: Укрпатентінорм, 2002. – 24 с.

2. Драник Г. Н. Клиническая иммунология и аллергология / Г. Н. Драник. – К.: Полиграф плюс, 2006. – 481 с.
3. Иммуномодулирующий эффект Берлитиона у ликвидаторов последствий аварии на ЧАЭС / [Зуева Н. А., Метелица Л. А., Коваленко А. Н., Ефимов А. С.] // Лікарська справа. – 2002. – № 1. – С. 24–26.
4. Караулов А. В. Клиническая иммунология и аллергология / А. В. Караулов. – М.: Медицинское информационное агентство, 2002. – 651 с.
5. Комиссаров И. В. Глицин как психофармакологическое средство / И. В. Комиссаров // Междунар. мед. журн. – 2000. – № 2. – С. 78–81.
6. Лаповець Л. Є. Посібник з лабораторної імунології / Л. Є. Лаповець, Б. Д. Луцик. – Львів: Видавництво Тараса Сороки, 2002. – 173 с.
7. Лебедев К. А. Иммуная недостаточность (выявление и лечение) / К. А. Лебедев, И. Д. Понякина. – М.: Медицинская книга, Н. Новгород: Издательство НГМА, 2003. – 443 с.
8. Маянский А. Н. Клинические аспекты фагоцитоза / А. Н. Маянский, О. И. Пикуза. – Казань: Магараф, 1993. – 192 с.
9. Науменко В. Г. Берлитион в лечении диабетической нейропатии / В. Г. Науменко // Укр. мед. часопис. – 1999. – №6(14). – С. 98–101.
10. Иммунология: Практикум / [Пастер Е. У., Овод В. В., Позур В. К., Вихоть Н. Е.]. – К.: Выща школа. изд-во при Киев. ун-те, 1989. – 304 с.
11. Чернушенко Е. Ф. Аутоиммунные болезни и их роль в клинике внутренних болезней / Чернушенко Е. Ф., Когосова Л. В., Голубка Т. В. – К.: Здоров'я, 1985. – 160 с.
12. Шмелев Е. И. К оценке теста восстановления нитросинего тетразолия у больных хроническими неспецифическими заболеваниями легких / Е. И. Шмелев // Лабораторное дело. – 1979. – С. 524–528.
13. Якобисяк М. Імунологія / М. Якобисяк. – Вінниця: Нова книга, 2004. – 625 с.
14. Ярылин А. А. Основы иммунологии / А. А. Ярылин. – М.: Медицина, 1999. – 650 с.

15. Фримель Г. Иммунологические методы / Г. Фримель. – М.: Медицина, 1987. – 472 с.
16. Воробьев А. А. Иммунология и аллергология цветной атлас: учебное пособие / Воробьев А. А., Быков А. С., Караулов А. В. – М.: Практическая медицина, 2006. – 288 с.
17. Arivazhaan P. Effect of DL-alpha-lipoic acid on glutathione metabolic enzymes in aged rats / Arivazhaan P., Ramanathan K., Pannerselvan C. // *Exp. Gerontol.* – 2001. – Vol. 37, №1. – P. 81–87.
18. Effects of alpha lipoic acid, ascorbic acid-6-palmitate, and fish oil on the glutathione, malonaldehyde, and fatty acids levels in erythrocytes of streptozotocin induced diabetic male rats / [Yilmaz O., Ozkan Y., Yildirim M. et al.]. // *Cell Biochem.* – 2002. – Vol. 86, №3. – P. 530–539.
19. Freisleben H. J. Lipoic acid reduces ischemia-reperfusion injury in animal models / H. J. Freisleben // *Toxicology.* – 2000. – Vol. 148, № 1–2. – P. 159–171.
20. Gilgun-Sherki Y. The role of oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis: the need for effective antioxidant therapy / Gilgun-Sherki Y., Melamed E., Offen D. // *J. Neurol.* – 2004. – Vol. 251, №3. – P. 261–268.
21. Hurn P. D. Estrogen as a neuroprotectant in stroke/ P. D. Hurn, I. M. Macrae // *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* – 2000. – Vol. 20. – P. 631–652.
22. Alpha lipoic acid inhibits T cell migration into the spinal cord and suppresses and treats experimental autoimmune encephalomyelitis / [Marracci G. H., Jones R. E., McKeon G. P., Bourdette D. N.] // *J Neuroimmunol.* – 2002. – Vol. 131, № (1–2). – P. 104–114.
23. Alpha-lipoic acid is effective in prevention and treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis / [Morini M., Roccatagliata L., Dell'Eva R. et al.] // *J. Neuroimmunol.* – 2004. – Vol. 148, № (1–2). – P. 146–153.
24. Protective effect of alpha-lipoic acid against ischaemic acute renal renal failure in rats / [Takaoka M., Ohkita M., Kobayashi Y. et al.] // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* – 2002. – Vol. 29, № 3. – P. 189–194.

ВЛИЯНИЕ α -ЛИПОЕВОЙ КИСЛОТЫ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ФАГОЦИТОВ

Ю. В. ЮЗВЕНКО¹, Л. М. ЯРЕМЕНКО²

¹*Национальный авиационный университет, г. Киев*

²*Национальный медицинский университет имени А. А. Богомольца, г. Киев*

В работе, на примере препарата берлитион, исследовано влияние антиоксидантов на факторы естественной резистентности организма. Выявлено влияние α -липоевой кислоты на характеристики клеточного звена иммунитета, а также на моделирование фагоцитарной и бактерицидной активности клеток крови крыс.

Ключевые слова: *иммунитет, гомеостаз, патогенные бактерии, антиоксиданты, факторы естественной резистентности, фагоцитоз, метаболическая активность клеток, α -липоевая кислота, препарат берлитион.*

THE INFLUENCE OF α -LIPOIC ACID ON THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF PHAGOCYTES

Y. V. YUZVENKO¹, L. M. YAREMENKO²

¹*National Aviation University, Kyiv*

²*Bogomolets National Medical University, Kyiv*

In this work, on the example of berlithion drug, studied the influence of antioxidants on factors of natural resistance of the organism. The influence of α -lipoic acid on the characteristics of cellular immunity and, to modulate phagocytic and bactericidal activity of blood cells of rats.

Keywords: *immunity, homeostasis, pathogenic bacteria, antioxidants, natural resistance factors, phagocytosis, metabolic activity of cells, α -lipoic acid, berlithion.*