

**О.В. Нікітін¹, Б.М. Галкін², Т.О. Філіпова²,
І.Й. Сейфулліна², Н.В. Шматкова²**

¹Одеський державний медичний університет, пров. Валіховський, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: +38 (048) 728 50 48, e-mail: nikitin_alex@mail.ru

²Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: +38 (048) 765 33 61, e-mail: bgalkin@ukr.net

ВПЛИВ КОМПЛЕКСІВ ГЕРМАНІЮ (IV) З САЛІЦИЛАЛЬГІДРАЗОНАМИ ХЛОРБЕНЗОЙНОЇ ТА НІТРОБЕНЗОЙНОЇ КИСЛОТ НА ВМІСТ ОСНОВНИХ ПОПУЛЯЦІЙ І СУБПОПУЛЯЦІЙ ЛІМФОЦИТІВ У МИШЕЙ ПРИ ЗАПАЛЕННІ

Показано, що при запаленні, викликаному зимозаном, імунорегуляторний коефіцієнт (CD4/CD8) зростає в 1,8 рази, що свідчить про активацію імунної системи. На тлі запалення також на 70% підвищується кількість NK-клітин. Досліджувані координаційні сполуки германію знижують число натуральних кілерів, вміст Т-хелперів і підвищують кількість Т-супресорів, що призводить до зменшення співвідношення CD4/CD8.

К л ю ч о в і с л о в а: германій (IV), координаційні сполуки, лімфоцити, запалення.

Нестероїдні протизапальні препарати (НПЗП) належать до числа найчастіше призначуваних “симптоматичних” препаратів, що зумовлено унікальним поєднанням в них протизапальних, анальгетичних, жарознижувальних і антитромботичних властивостей, якого не мають інші лікарські засоби [1, 3, 6].

Сучасні підходи до створення нових НПЗП базуються на пошуку сполук, що мають меншу токсичність та не поступаються активністю існуючим препаратам даної групи [1]. На сьогоднішній день, перспективним є також створення НПЗП з імуномодулювальною дією [4].

У попередніх роботах нами були відібрані, шляхом скринінгових досліджень, комплексні сполуки германію (IV) з найбільш високою протизапальною активністю ($[\text{Ge}(\text{3-Cl-L})_2]$, $[\text{Ge}(\text{4-NO}_2\text{-L})_2]$) [7, 9]. Германій був обраний як метал-комплексоутворювач у зв'язку з тим, що його сполуки відрізняються високою фармакологічною активністю і відносно низькою токсичністю [5].

Авторами доведено [8], що протизапальна активність комплексів $[\text{Ge}(\text{3-Cl-L})_2]$ та $[\text{Ge}(\text{4-NO}_2\text{-L})_2]$ обумовлена впливом на цитокіновий профіль: встановлено гальмування продукції в організмі прозапальних цитокінів ФНП- α і ІФН- γ та стимуляцію синтезу протизапального цитокіна — ІЛ-10. Слід зазначити, що цитокіни переважно синтезуються різними імунокомпетентними клітинами [10].



Метою дослідження було вивчення впливу комплексів германію (IV) з саліцилальгідрозонами хлорбензойної та гідроксибензойної кислот на вміст основних популяцій та субпопуляцій лімфоцитів в умовах експериментального запалення.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на білих безпородних мишах масою 17–22 г (у кожній групі по 8 тварин) на моделі запалення — шестиденного повітряного мішка [11]. Для відтворення запалення тварин анестезували, після чого під шкіру на спині вводили 5 мл повітря. Через 3 доби для підтримки мішка вводили ще 3 мл повітря. На 6 добу у мішок вводили 1 мл 1% розчину зимозану у фізіологічному розчині. У ролі НПЗП були використані: $[\text{Ge}(3\text{-Cl-L})_2]$ та $[\text{Ge}(4\text{-NO}_2\text{-L})_2]$, які були синтезовані на кафедрі загальної хімії і полімерів ОНУ імені І.І. Мечникова. Досліджувані комплекси вводили у дозі 50 мг/кг одноразово у вигляді водної суспензії, стабілізованої твіном-80, внутрішньошлунково або безпосередньо в мішок через 1 годину після ін'єкції зимозану.

В ході дослідження визначали фенотипові характеристики лімфоцитів:

1. CD3 — загальна кількість Т-лімфоцитів;
2. CD4 — Т-хелпери (індуктори);
3. CD8 — цитотоксичні Т-лімфоцити (супресори);
4. CD19 — загальна кількість В-лімфоцитів;
5. CD16 — натуральні кілери (NK-клітини).

Крім того, розраховували імунорегуляторний індекс — співвідношення CD4/CD8.

Визначення числа основних популяцій та субпопуляцій лімфоцитів у лімфатичних вузлах здійснювали за допомоги люмінесцентної мікроскопії. Клітини мітили FITC-кон'югованими моноклональними антитілами фірми «eBioscience», США, до мишачих CD19, CD3, CD4, CD8 та рап NK рецепторів.

Отримані результати опрацьовували методами варіаційної статистики з використанням критеріїв Фішера-Ст'юдента, застосовуючи програму Excel-2000 [2].

Результати дослідження та їх обговорення

Отримані дані (табл.) свідчать про те, що при запаленні порівняно з інтактним контролем приблизно на 20% знижується відносна кількість Т-лімфоцитів (CD3), що може бути пов'язано з активною міграцією цих клітин у вогнище запалення. Одночасно у лімфовузлах зростає відносний вміст В-лімфоцитів (CD19). Результатом таких змін у складі основних популяцій лімфоцитів є значне зниження співвідношення Т-клітини/В-клітини з 4,38 до 2,91. На тлі запалення також суттєво підвищується кількість NK-клітин — на 70%, що корелює з високим рівнем γ -інтерферону, який був встановлений нами раніше [8].

Значних змін зазнає також склад субпопуляцій Т-лімфоцитів: на 34% зростає вміст Т-хелперів і на 27% зменшується вміст Т-супресорів. Внаслідок цього значно, майже удвічі, підвищується величина імунорегуляторного індексу. Це свідчить про активацію імунної системи і її участь у реалізації запальної відповіді.

Досліджувані комплексні сполуки германію не тільки чинять протизапальну дію, але і сприяють нормалізації деяких імунологічних показників. Зокрема, спостерігається збільшення відносного вмісту Т-лімфоцитів супресорів, що, в свою чергу, зменшує значення імунорегуляторного індексу.



Таблиця
Вплив комплексних сполук германію на вміст основних популяцій та субпопуляцій
лімфоцитів (%) на тлі запалення ($M \pm m$; $n=8$)

Table
Germanium coordination compounds influence on the content of the basic
lymphocytes populations and subpopulations in the course of inflammation
($M \pm m$; $n=8$)

Варіант	CD19	CD3	CD4	CD8	CD4/CD8	CD16
Контроль	17,2 $\pm$ 1,5	75,4 $\pm$ 7,2	48,0 $\pm$ 5,1	25,8 $\pm$ 2,4	1,86 $\pm$ 0,17	8,6 $\pm$ 0,9
Неліковані тварини	21,2 $\pm$ 2,0	61,7 $\pm$ 5,7*	64,5 $\pm$ 6,1*	18,9 $\pm$ 1,8*	3,41 $\pm$ 0,32*	14,5 $\pm$ 1,1*
[Ge(4-NO ₂ -L) ₂] per os	20,5 $\pm$ 1,9	65,2 $\pm$ 6,4	62,5 $\pm$ 5,8	26,2 $\pm$ 2,7	2,36 $\pm$ 0,27	10,6 $\pm$ 1,2*
[Ge(4-NO ₂ -L) ₂] у мішок	20,7 $\pm$ 2,2	63,8 $\pm$ 6,1	64,1 $\pm$ 6,0*	20,1 $\pm$ 1,7	3,19 $\pm$ 0,28*	12,7 $\pm$ 1,3*
[Ge(3-Cl-L) ₂] per os	20,0 $\pm$ 1,9	62,2 $\pm$ 6,3	66,7 $\pm$ 6,3*	24,9 $\pm$ 2,1	2,68 $\pm$ 0,24	11,0 $\pm$ 1,2*
[Ge(3-Cl-L) ₂] у мішок	22,5 $\pm$ 2,0	63,7 $\pm$ 6,5	62,3 $\pm$ 5,9	19,4 $\pm$ 1,9	3,21 $\pm$ 0,26*	13,2 $\pm$ 1,3*

Примітка: * — різниця вірогідна у порівнянні з контролем

Таким чином, поряд із зменшенням вмісту в організмі тварин прозапальних цитокінів (фактору некрозу пухлин α і інтерферону γ) ці сполуки знижують рівень активації імунних реакцій. Слід зазначити, що з боку кількісних показників CD3, CD19, CD16 і CD4 лімфоцитів виражених змін не відбувається. Але можна припустити зниження деяких функціональних властивостей цих клітин, зокрема, НК-клітин, які є головними продуцентами імунного інтерферону. В цілому отримані раніше [7–9] і наведені у даній роботі результати свідчать про те, що комплексні сполуки германію не тільки сприятливо впливають на перебіг гострого запалення, але і запобігають його переходу в імунну фазу. Також слід зазначити, що імуномодулювальна дія комплексних сполук германію більш виражена при їх внутрішньошлунковому введенні.

Таким чином, показано, що на тлі запалення, викликаного зімозаном, у лімфовузлах мишей знижується вміст CD3 і дещо підвищується кількість CD19 лімфоцитів. За рахунок зростання кількості Т-клітин хелперів і зменшення Т-клітин супресорів суттєво підвищується значення імунорегуляторного індексу.

У результаті роботи доведено, що досліджувані комплекси [Ge(3-Cl-L)₂] та [Ge(4-NO₂-L)₂] виявляють імуномодулювальну дію, яка виявляється у нормалізації вмісту досліджуваних імуноцитів. Досліджувані сполуки в більшому ступені впливають на імунологічні показники при внутрішньошлунковому введенні, ніж при введенні безпосередньо у вогнище запалення.



ЛІТЕРАТУРА

1. Акбаров А.Б., Харитонов Ю.Я., Исламов М.Н. Бионеорганические аспекты особенностей взаимосвязи типа состав-строение-специфическая активность биоконплексов // Журн. неорг. химии. — 1993. — Т. 38, № 2. — С. 312–327.
2. Горлач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel — К.: Морион, 2000. — 320 с.
3. Дзяк Г.В., Степанов Ю.М., Грищенко В.І., Куцніренко І.В. Сучасний погляд на гастропатії, викликані нестероїдними протизапальними препаратами // Сучасна гастроентерологія. — 2003. — № 1. — С. 4–10.
4. Доклінічні дослідження лікарських засобів: методичні рекомендації / За редакцією О.В. Стефанова. — К.: Авіцена, 2001. — 527 с.
5. Лукевиц Э.Я., Гар Т.К., Игнатович Л.М., Миронов В.Ф. Биологическая активность германия — Рига: Зинатне, 1990. — 191 с.
6. Насонов Е.Л. Применение нестероидных противовоспалительных препаратов: терапевтические перспективы // РМЖ. — 2002. — Т. 10, № 4. — С. 206–212.
7. Нікітін О.В., Галкін Б.М., Сейфулліна І.Й., Філіпова Т.О., Шматкова Н.В. Протизапальна активність комплексів германію (IV) з саліцилальгідразонами нітробензойної кислоти // Одеський медичний журнал. — 2003. — № 2. — С. 21–23.
8. Нікітін О.В., Галкін Б.М., Сейфулліна І.Й., Філіпова Т.О., Шматкова Н. В. Вплив на цитокіновий профіль комплексів германію (IV) з саліцилальгідразонами хлорбензойної та нітробензойної кислоти на моделі експериментального запалення // Одеський медичний журнал. — 2008. — № 3. — С. 3–5.
9. Нікітін О.В., Галкін Б.М., Сейфулліна І.Й., Шматкова Н.В. Вплив комплексів германію (IV) з саліцилальгідразонами хлорбензойної та нітробензойної кислот на лейкоцитарну формулу крові при гострому запаленні // III Національний з'їзд фармакологів України, 17–20 жовтня 2006 р., Одеса: тези доп. — Одеса: ОДМУ, 2006. — С. 125–126.
10. Черешнев В.А., Гусев Е.Ю. Системное воспаление как иммунопатобиологический феномен // Цитокины и воспаление. — 2002. — Т. 1, № 2. — С. 17–26.
11. Vicente A.M., Guillen M.I., Alcaraz M.J. Participation of Heme Oxygenase-1 in a model of acute inflammation // Exp. Biol. Med. — 2003. — V. 228. — P. 514–516.

А.В. Никитин¹, Б.Н. Галкин², Т.О. Филиппова², И.И. Сейфуллина²,
Н.В. Шматкова²

¹Одесский государственный медицинский университет, пер. Валиховский, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: +38 (048) 728 50 48, e-mail: nikitin_alex@mail.ru

²Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова, ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: +38 (048) 765 33 61, e-mail: bgalkin@ukr.net

ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСОВ ГЕРМАНИЯ (IV) С САЛИЦИЛАЛЬГИДРАЗОНАМИ ХЛОРБЕНЗОЙНОЙ И НИТРОБЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТ НА СОДЕРЖАНИЕ ОСНОВНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ И СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ У МЫШЕЙ ПРИ ВОСПАЛЕНИИ

Реферат

Показано, что при воспалении, вызванном зимозаном, иммунорегуляторный коэффициент (соотношение CD4/CD8) возрастает в 1,8 раза, что свидетельствует об активации иммунной системы. На фоне воспаления на 70% увеличивается ко-



личество НК-клеток. Изученные координационные соединения германия снижают число натуральных киллеров, содержание Т-хелперов и повышают количество Т-супрессоров, что приводит к уменьшению соотношения CD4/CD8.

К л ю ч е в ы е с л о в а: германий (IV), координационные соединения, лимфоциты, воспаление.

O.V. Nikitin¹, B.M. Galkin², T.O. Philipova², I.I. Seifullina², N.V. Shmatkova²

¹Odesa National I.I. Mechnykov University, Dvoryanska str., 2, Odesa, 65082, Ukraine, tel.: +38 (048) 765 33 61, e-mail: bgalkin@ukr.net

²Odesa State Medical University, Valikhovsky lane, 2, Odesa, 65082, Ukraine, tel.: +38 (048) 728 50 48, e-mail: nikitin_alex@mail.ru

**THE INFLUENCE OF COORDINATION COMPOUNDS OF
GERMANIUM (IV) WITH NITROBENZOIC AND CHLORBENZOIC
ACIDS SALICYLALHYDRAZONES ON THE CONTENT OF THE
BASIC LYMPHOCYTES POPULATIONS AND SUBPOPULATIONS
IN THE COURSE OF INFLAMMATION IN MICE**

Summary

It was shown that in zymozan induced inflammation CD4/CD8 ratio increased for 1.8 times, that showed immune system activation. Also on the background of inflammation NK-cells content increased for 70%. Studied coordination compounds of germanium decrease the level of NK-cells and T-helpers but increase the level of T-suppressors that result in decreasing of CD4/CD8 ratio.

K e y w o r d s: germanium (IV), coordination compounds, lymphocytes, inflammation.

