

УДК: 616.5+616.97+616.43+616-008.9+616.39

ВЛИЯНИЕ ИНТЕНСИФИКАЦИИ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ НА МОРФОГЕНЕТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ЛИМФОЦИТОВ

¹Юлдашев Н.М., ¹Нишантаев М.К., ²Сайдалиходжаева О.З., ²Жуманова Н.А.

¹*Ташкентский педиатрический медицинский институт;*

²*Ташкентская медицинская академия, Ташкент, e-mail: y_nosir@rambler.ru*

Целью настоящего исследования явилась оценка влияния интенсификации свободнорадикального окисления липидов мембран лимфоцитов на их адаптивные возможности. Эксперименты проведены на 193 белых мышах, массой 16–23 г. Степень индукции и ингибирование монооксигеназной системы печени оценивали по длительности гексеналового сна. Гексенал животным вводили внутривентриально в дозе 100 мг/кг массы тела. Показано, что введение интактным животным-реципиентам лимфоцитов, выделенных из животных-доноров с индуцированной бензоалом (вводили перорально в дозе 50 мг/кг массы, в течение 3 дней) и ингибированной CoCl₂ (вводили внутривентриально, в дозе 15 мг/кг однократно) монооксигеназной системой печени, соответственно приводит к индуцированию и ингибированию этой системы у реципиентов. Интенсификация процесса свободнорадикального окисления мембранных липидов этих лимфоцитов, путем добавления прооксиданта Fe²⁺ и инкубации при 37 °С в течение 30 минут, привела к утрате ими возможности адаптивного переноса информации о функциональном состоянии монооксигеназной системы печени. Делается вывод о важности целостности клеточной структуры для проявления морфогенетической функции лимфоцитов.

Ключевые слова: адаптивные лимфоциты, свободнорадикальное окисление липидов, монооксигеназная система, индукция, ингибирование

THE INFLUENCE OF THE INTENSIFICATION OF FREE RADICAL LIPIDIC PEROXIDATION ON MORPHOGENETIC ACTIVITY OF LYMPHOCYTES

¹Yuldashev N.M., ¹Nishantaev M.K., ²Saydalikhodjaeva O.Z., ²Jumanova N.A.

¹*Tashkent pediatric medical institute;*

²*Tashkent medical academy, Tashkent, e-mail: y_nosir@rambler.ru*

The aim of the research was the valuation of the influence on intensification of free radical lipidic peroxidation of membrane lymphocytes on their adaptive abilities. The experiments were conducted on 193 white mice, which weighted 16–23g. The induction and inhibition degree of liver monoxygenase system was assessed by the duration of hexenale sleep tests. Hexenale was injected into animals by intraperitoneal way with the dose of 100 mg/kg mass of body. It was shown that injecting lymphocytes, isolated from animal-donors with induced benzonal (injected by mouth with the dose of 50 mg/kg mass, during 3 days) and inhibited CoCl₂ (injected intraperitoneal, with the dose of 15 mg/kg once) liver monoxygenase system, into intact animal-recipients brings to the induction and inhibition of this system in recipients correspondingly. Intensification of the free radical oxidation process of the lipids in lymphocytes membrane, which was isolated from donors, by adding prooxidant Fe²⁺ and induction under 37 °C during 30 minutes, brings to the loss of the capacity to adaptive carrying information about functional condition of liver monoxygenazed system. The conclusion is the importance of cell structure continuity for presentation of morphogenetic lymphocyte function.

Keywords: adoptive lymphocyte, free radical lipidic peroxidation, monoxygenase system, induction, ingibition

В последние годы наблюдается появление совершенно новых технологий, которые кардинально меняют наше понимание структуры и функции живой системы. Эти технологии не только пополняют наши знания о живой системе, но и позволяют регулировать ее функционирование, что очень важно с позиций коррекции нарушенных функций. Одними из таких технологий являются клеточные технологии. Под клеточными технологиями в настоящее время понимают применение стволовых клеток для восстановления структурно измененных частей ткани, для замещения некротизированных участков различных тканей нормальными клетками этих же тканей. Однако если учесть, что в основе этих технологий все же лежит использование клеток, то применение других, дифференцирован-

ных клеток для аналогичных целей, или же для моделирования различных состояний и коррекции определенных нарушений также можно отнести к клеточным технологиям.

В этом плане особый интерес представляют адаптированные лимфоциты. В настоящее время показано, что с помощью адаптированных лимфоцитов можно переносить информацию о регенерации, о хроническом токсическом гепатите, нефрозонофрите, панкреатите, гипертрофии миокарда и почек, остеопетрозе и стрессе [1]. Несмотря на доказанность факта переноса адаптированными лимфоцитами информации о функциональном состоянии одного организма другому, механизмы данного явления все же остаются нераскрытыми. А priori можно предполагать зависимость адаптивной функции лимфоцитов от струк-

турной целостности их мембран. В то же время известно, что активация свободнорадикального процесса в биологических мембранах приводит к нарушению целостности всей клеточной системы [3].

Исходя из вышеизложенного, целью настоящего исследования явилась оценка влияния интенсификации свободнорадикального окисления липидов лимфоцитов на их адаптивные возможности.

Материал и методы исследования

Исследования были проведены на 193 белых беспородных мышах-самцах, массой 16–23 г.

Критерием, позволяющим оценить степень переноса информации о функциональном состоянии организма с помощью лимфоидных клеток, считали функционально активное и ингибированное состояние монооксигеназной системы (МОС) печени. Для получения функционально активного состояния МОС был введен индуктор – бензонал, а для получения функционально пассивного состояния – ингиби-

тор CoCl_2 . Бензонал вводили мышам в дозе 50 мг/кг массы тела на крахмальном клейстере, перорально в течение 3 дней [5]. CoCl_2 вводили мышам в виде водного раствора в дозе 15 мг/кг массы тела, внутривнутрибрюшинно 1 раз [5].

После моделирования различных функциональных состояний МОС животные забивались под эфирным наркозом. Выделяли общую популяцию лимфоцитов из лимфатических узлов брыжейки, которые в количестве 5 млн на мышь вводили интактным животным. Через день после введения лимфоцитов изучалась длительность гексеналового сна, которая характеризует *in vivo* состояние МОС печени. Гексенал животным вводили внутривнутрибрюшинно в дозе 100 мг/кг массы тела [5].

Для исследования роли целостности мембран адаптированных лимфоцитов в осуществлении переноса информации о функциональном состоянии МОС, у мышей вызвали ее индукцию и ингибирование, после чего животных забивали и выделяли общую популяцию лимфоцитов из лимфатических узлов брыжейки. Схема эксперимента приведена на рис. 1.

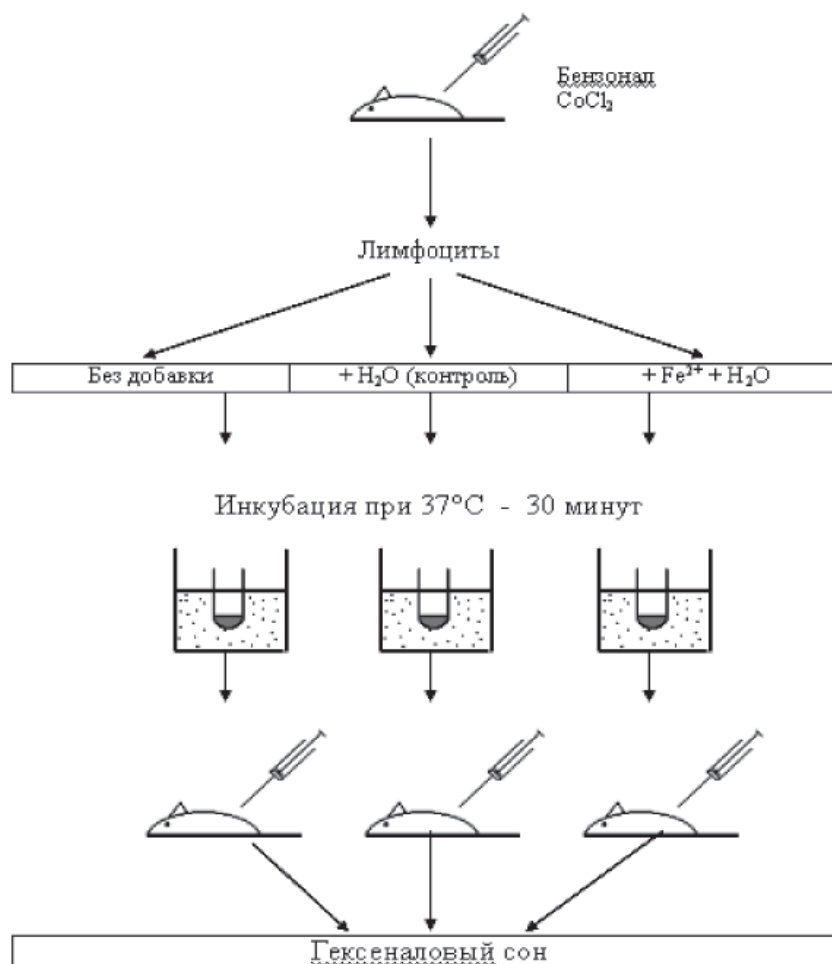


Рис. 1. Схема эксперимента по изменению компонентов мембран лимфоцитов путем активации свободнорадикального окисления липидов

Суспензию лимфоцитов разделяли на 3 части. К первой добавляли 2 мМ Fe^{2+} (прооксидант) в объеме 0,02 мл (опыт), во вторую – дистиллированную воду в том же объеме (контроль), а третью часть оставляли

без изменений (интакт). Первую и вторую пробирку с суспензиями лимфоцитов, инкубировали в водяном термостате в течение 30 минут при 37°C . После инкубации из всех пробирок брали по 0,2 мл суспензии

для определения содержания продуктов свободнорадикального окисления липидов (СРОЛ). Остальные лимфоциты были введены интактным мышам в количестве 5 млн на мышь. Через день после введения лимфоцитов изучалась длительность гексеналового сна.

Состояние процесса СРОЛ оценивали по содержанию диеновых (ДК), триеновых конъюгатов (ТК) и по индексу окисленности (ИО) липидов. Содержание ДК и ТК в сыворотке крови определяли по методу В.Б. Гаврилова и М.И. Мишкорудной (1983) [4]. Принцип метода заключается в экстракции ДК и ТК смесью гептан-изопропанола в кислой среде с последующим измерением оптической плотности при длине волны 233 и 278 нм на спектрофотометре (В работе был использован двухволновой спектрофотометр «Hitachi-330», Япония). Содержание ДК и ТК рассчитывали в относительных единицах на мл суспензии (Е/мл) лимфоцитов. Степень ИО липидов определяли по соотношению продуктов, поглощающих УФ-излучение на разной длине волн, т.е. по отношению 232/215 нм, где 215 нм – это максимум поглощения ненасыщенных липидов [2].

Результаты подвергали статистической обработке с применением критерия *t* Стьюдента.

Результаты исследований и их обсуждение

Проведенные исследования показали, что при введении общей популяции лимфоцитов, выделенных из контрольных мышей (получавшие крахмальный клейстер без индуктора МОС), к интактным животным длительность гексеналового сна равнялась $31,90 \pm 1,19$ мин. При этом мыши без экспериментального вмешательства пребывали в наркотическом сне $30,85 \pm 0,52$ мин. При введении общей популяции лимфоцитов, выделенных из животных с индуцированной МОС к интактным мышам, длительность гексеналового сна равнялась $23,70 \pm 0,59$ мин. Следовательно, при введении интактным животным общей популяции лимфоцитов, выделенной из животных с индуцированной МОС, наблюдается статистически значимое укорочение длительности гексеналового сна на 25,7 и 23,2% по сравнению с контролем и нормой соответственно.

При введении общей популяции лимфоцитов, выделенных из контрольных мышей (получавшие соответствующий объем дистиллированной воды без ингибитора МОС печени), к интактным животным длительность гексеналового сна равнялась $31,00 \pm 0,65$ мин. При введении общей популяции лимфоцитов, выделенных из животных с ингибированной МОС печени к интактным, длительность гексеналового сна равнялась $53,8 \pm 3,0$ мин. Следовательно, при введении интактным животным общей популяции лимфоцитов, выделенной из животных с ингибированной МОС, наблюдается статистически значимое удлинение длительности гексеналового сна на 73,6

и 74,4% по сравнению с контролем и нормой соответственно.

Таким образом, результаты свидетельствуют, что с помощью адаптированных лимфоцитов можно перенести информацию о функциональном (индуцированном или ингибированном) состоянии МОС печени из одного организма в другой. При этом возникает вопрос: влияет ли целостность клеточной мембраны на процесс переноса информации?

Для ответа на этот вопрос, полученную из мышей с индуцированной и ингибированной МОС печени, общую популяцию лимфоцитов разделяли на 3 части. В первую часть добавляли прооксидант (Fe^{2+}), во вторую – соответствующий объем воды (контроль), а третью оставляли без вмешательства (интакт). Через 30 мин инкубации при 37°C в пробах изучали содержание продуктов ПОЛ.

Результаты исследований показали, что в первой части лимфоцитов, выделенной из индуцированной МОС печени, содержание ДК равнялось $0,8 \pm 0,04$ Е/мл, тогда как во второй и третьей частях оно было равно $0,25 \pm 0,02$ и $0,20 \pm 0,01$ Е/мл соответственно (рис. 2,а). При этом содержание ТК в первой части равнялось $0,47 \pm 0,03$ Е/мл, а во второй и третьей – $0,12 \pm 0,002$ и $0,08 \pm 0,001$ Е/мл соответственно. ИО липидов был равен $0,45 \pm 0,03$; $0,24 \pm 0,02$ и $0,22 \pm 0,02$ соответственно в первой, второй и третьей частях суспензии лимфоцитов.

На основании полученных результатов можно констатировать, что в первой части лимфоцитов наблюдается значительное повышение интенсивности процесса СРОЛ, по сравнению со второй и третьей фракциями лимфоцитов.

Далее эти же лимфоциты были введены интактным мышам и через сутки изучали длительность гексеналового сна. Результаты показали, что у мышей, получавших адаптированные лимфоциты, выделенных от животных с индуцированным СРОЛ, длительность гексеналового сна равняется $28 \pm 2,1$ минутам, тогда как у мышей, получивших адаптированные лимфоциты без индукции СРОЛ, он равнялся $20,0 \pm 1,7$ и $19,7 \pm 1,5$ мин (рис. 2,б).

Следовательно, индукция процесса СРОЛ в лимфоцитах приводит к исчезновению способности переноса ими информации о функционально активном состоянии МОС печени из одного организма в другой.

В случае с ингибированной МОС печени первой части лимфоцитов содержание ДК равнялось $0,85 \pm 0,05$ Е/мл, тогда как во второй и третьей частях оно было равно $0,22 \pm 0,02$ и $0,24 \pm 0,02$ Е/мл соответственно (рис. 3,а).

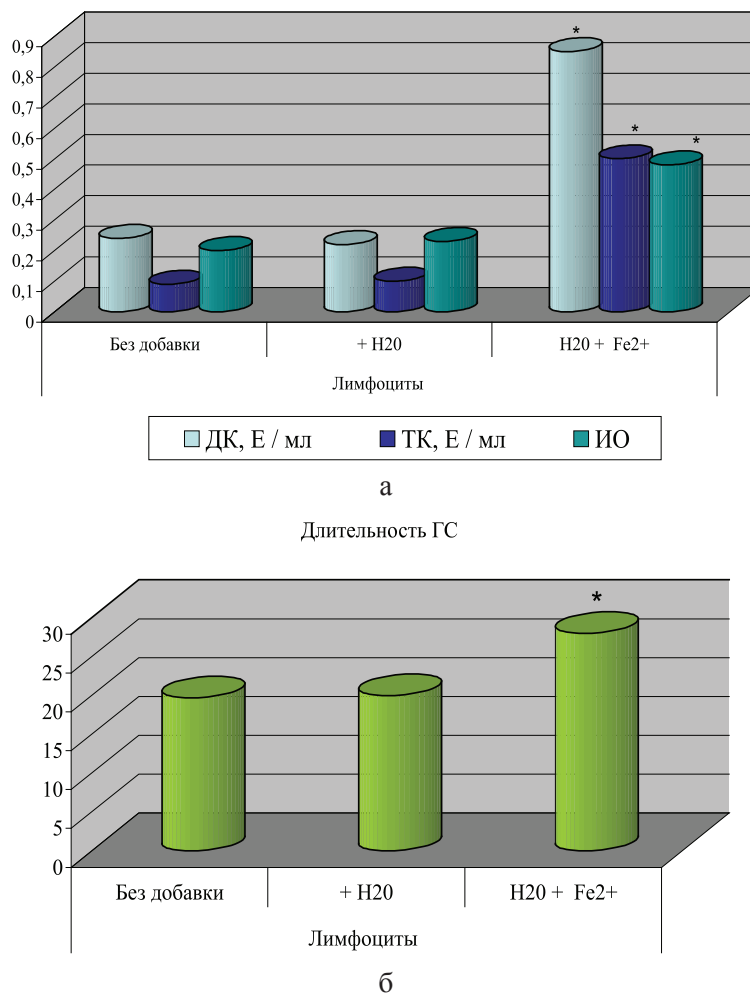


Рис. 2. Влияние интенсификации СРОЛ адаптированных лимфоцитов на процесс переноса информации о функционально активном состоянии МОС печени:
 а – состояние СРОЛ в 3 фракциях лимфоцитов; б – длительность гексеналового сна у мышей при введении 3 фракции лимфоцитов. * – $P < 0,05$ по сравнению со значениями группы без добавки

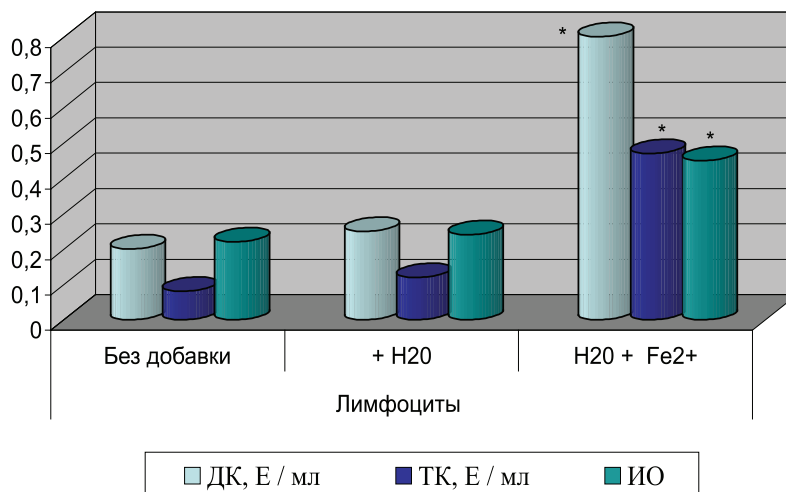
При этом содержание ТК равнялось $0,50 \pm 0,04$ Е/мл, а во второй и третьей части оно было равно $0,10 \pm 0,004$ и $0,09 \pm 0,001$ Е/мл соответственно. ИО липидов был равно $0,48 \pm 0,04$; $0,23 \pm 0,02$ и $0,20 \pm 0,01$ соответственно в первой, второй и третьей частях суспензии лимфоцитов.

Полученные результаты указывают на значительное повышение интенсивности процесса СРОЛ в первой части лимфоцитов по сравнению со второй и третьей фракциями лимфоцитов.

Проведенный через день гексеналовый тест выявил, что у мышей, получавших адаптированные лимфоциты, выделенных от животных с индуцированным СРОЛ, длительность гексеналового сна равняется $29 \pm 2,5$ мин, тогда как у мышей, получивших адаптированные лимфоциты без индукции СРОЛ, он равнялся $38,8 \pm 2,3$ и $37,7 \pm 2,5$ мин (рис. 3,б). Следовательно, индукция процесса СРОЛ в лимфоцитах

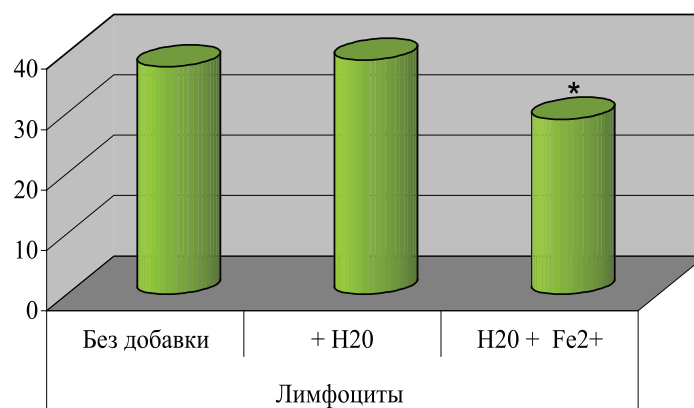
приводит к исчезновению способности переноса ими также информацию о пассивном состоянии МОС печени из одного организма в другой.

Таким образом, полученные результаты показали, что введение интактным животным лимфоцитов, выделенных из животных с индуцированной и ингибированной МОС печени, соответственно приводит к индуцированию и ингибированию этой системы у реципиентов. Интенсификация процесса свободнорадикального окисления липидов в мембране лимфоцитов, выделенных из доноров, приводит к утрате ими возможности переноса информации о функциональном состоянии организма. Это наводит на мысль, что перенос информации о функциональном состоянии одного организма к другому, осуществляется целостной клеткой и, скорее всего, происходит на уровне цитоплазматической пограничной мембраны адаптированного лимфоцита.



а

Длительность ГС



б

Рис. 3. Влияние интенсификации СРОЛ адаптированных лимфоцитов на процесс переноса информации о функционально пассивном состоянии МОС печени

Работа выполнена на основании прикладного научного гранта Республики Узбекистан 31.11 «Создание новых моделей патологических состояний с помощью адаптированных лимфоцитов».

Список литературы

1. Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Зотиков Е.А. Роль лимфоцитов в оперативном изменении программы развития тканей. – М.: Изд. РАМН, 2009. – 108 с.
2. Биленко М.В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов (молекулярные механизмы, пути предупреждения и лечения). – М.: Медицина, 1989. – 368 с.
3. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы в биологических системах // Соросовский образоват. журн. – 2000. – № 2. – С. 3–18.

4. Гаврилов В.Б., Мишкорудная М.И. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови // Лаб. дело. – 1983. – № 3. – С. 33–35.

5. Юлдашев Н.М. Взаимосвязь ферментов монооксигеназной системы с развитием некротического процесса в сердечной мышце при экспериментальном инфаркте миокарда: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Ташкент, 1997. – 38 с.

Рецензенты:

Батырбеков А.А., д.м.н., профессор, зам. директора института иммунологии Академии наук Республики Узбекистан, г. Ташкент;
 Тухтаев К.Р., д.м.н., профессор, профессор кафедры гистологии и медицинской биологии Ташкентской медицинской академии, г. Ташкент.

Работа поступила в редакцию 25.07.2011.