

УДК: 616 – 092.18 – 008.9:661.177

ВИЗНАЧЕННЯ СТАНУ ЦИТОПЛАЗМАТИЧНИХ КЛІТИННИХ МЕМБРАН ЗА ДОПОМОГОЮ МЕТОДІВ БІОХЕМІЛЮМІНЕСЦЕНЦІЇ ТА ФОСФОРЕСЦЕНЦІЇ

О.В. Сіренко

Харківська медична академія післядипломної освіти, Україна

РЕЗЮМЕ

Експериментально визначено підвищення рівнів світіння біологічних субстратів, інтенсифікацію фосфоресценції і підвищення змісту 2,4-динітрофенілальдогідрозонів і 2,4-динітрофенілкетогідрозонів в біологічних рідинах і гомогенатах тканин органів білих щурів, які отримували субтоксичні дози органічних сумішей на основі ПЕГ впродовж 45 діб. Отримані дані дозволяють припустити здатність досліджуваних речовин підвищувати щільність білково-ліпідного шару мембрани цитоплазми, інтенсифікувати вільнорадикальні процеси, перекисне окислення ліпідів і білків, змінювати структуру і функцію клітинної мембрани, що негативно впливає на метаболізм.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: поліетиленгліколи, клітинні мембрани, біохемілюмінесценція, фосфоресценція

У теперішній час все більшого значення набуває визначення ролі цитоплазматичних мембран та їх рецепторів у регуляції внутрішньоклітинного метаболізму, особливо мембрани [1]. Зовнішня мембрана клітини будується із полярних ліпідів та білків, які обумовлюють її функцію. Зміни структурних компонентів мембрани під впливом ксенобіотиків можуть обумовлювати виникнення сигналу для функціональної перебудови клітини. Сучасні уявлення про патологічні та донозологічні стани спираються на провідну роль структурно-функціональних одиниць організму у підтриманні динамічної гомеостатичної рівноваги та здатності адаптуватися до змін внутрішнього та навколишнього середовища організму [2]. В основі виникнення багатьох патологічних процесів лежать порушення мембрани та зміни внутрішньоклітинного метаболізму, які можуть виникати під впливом шкідливих хімічних агентів. Цитоплазматичні мембрани відповідають не тільки за регуляцію транспорту речовин, а також і за підтримку міжклітинних контактів шляхом активації рецепторів та специфічних ділянок ідентифікації. Визначення змін структурно-функціонального стану клітинної мембрани є важливим компонентом прогнозування донозологічних та патологічних станів, що виникають внаслідок дії ксенобіотиків [8]. До таких речовин відносяться складні органічні суміші, синтезовані на основі поліетиленгліколів (ПЕГ) різних марок, що широко використовуються у народному господарстві, але дія яких на організм недостатньо визначена. Уточнення патофізіологічних механізмів виникнення структурних та метаболічних змін у клітині під впливом нових хімічних речовин є од-

під впливом екзогенних шкідливих чинників. Інформативною є оцінка функціонального стану клітини шляхом визначення щільності білково-ліпідного шару цитоплазматичної нією з актуальних задач профілактичної медицини. Відомо, що оптимальному рівню інтенсивності метаболізму відповідає конкретна інтенсивність спонтанного світіння біологічних субстратів (БХЛ), що обумовлена вільнорадикальним окисненням ліпідних компонентів клітинних мембран [5]. Здатність до найбільш вираженого світіння належить ліпідам, при цьому для кожного органа або тканини є свої специфічні рівні світіння, що змінюються під впливом різноманітних патогенів, або у разі виникнення структурно-метаболічних порушень клітинної мембрани [5, 7]. Хемілюмінесценція гомогенатів тканин з високою точністю віддзеркалює стан ліпідного шару клітинної мембрани, що забезпечує її гідрофобні властивості та щільність. У той же час, відомо, що різноманітні функції біомембран обумовлені білками, що входять до їх складу [1]. Білки розташовані або на поверхні, або у товщі гідрофобного шару мембрани. Однією з особливостей мембранних білків є підвищений вміст гідрофобних кінцівок амінокислот у порівнянні з гідрофільними. Підвищені рівні активних форм кисню здатні впливати не тільки на ліпідні, а й на білкові структури мембрани, що може суттєво змінити не тільки структуру, але і функцію клітини. Метод фосфоресценції, результати якого добре співвідносяться з результатами електронного парамагнітного резонансу, дозволяє оцінити окислювальну модифікацію білків з високою точністю. Одним з розділів НДР «Наукове обґрунтування біохі-

мічної моделі структурно-метаболических зрушень в організмі внаслідок впливу екологічних чинників як прогностичної основи донологічних станів” (№ 0199V001767) було визначення впливу складних органічних сумішей, синтезованих на основі ПЕГ, на стан цитоплазматичних мембран.

Мета роботи. Визначення структурних змін клітинних цитоплазматичних мембран гомогенатів органів білих щурів, що отримували 1/100 LD₅₀ органічних сумішей у підго-строуму експерименті, методами біохемілю-мінесценції та фосфоресценції.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Експеримент проведено на 95 щурах популяції Вістар (самці, самиці) масою 180±10 г, яким протягом 45 діб щоденно внутрішньошлунково вводили 0,184 г/кг охолоджувальної рідини (ОР-40); 0,16 г/кг гальмівної рідини «Роса» (ГР); 0,117 г/кг гідравлічної рідини (ГдР), що дорівнює 1/100 LD₅₀ цих сумішей. У теперішній час велику увагу привертають наслідки тривалого впливу на організм ксенобіотиків у субтоксичних дозах [2], що і визначило вибір концентрації окиснення білків та їх окислювальну модифікацію оцінювали по інтенсивності фосфоресценції мембран [7] та рівнях утворення альдо- та кетогідразонів [6], за цим же методом визначали структурно-функціональний стан мембран еритроцитів та лімфоцитів.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Динаміка спонтанної, індукованої та люмінолзалежної БХЛ свідчила про підвищення інтенсивності світіння сироватки крові та гомогенатів органів щурів, що отримували органічні суміші (табл. 1). Найбільш виражені відхилення від показників контрольних груп зареєстровані під час оцінки інтенсивності люмінолзалежної хемілюмінесценції сироватки крові (2030-2660 імп/с). Динаміка БХЛ дозволяє припустити здатність досліджуваних органічних сумішей ініціювати вільнорадикальні процеси та збільшення у тканинах рівнів активних форм кисню, що може зашкоджувати білково-ліпідний шар цитоплазматичної мембрани. Активізація перекисного окиснення ліпідів спроможна при-

речовин. Основним компонентом усіх багатоскладових органічних сумішей був ПЕГ. Контрольну групу склали інтактні тварини, що отримували 2 мл води на добу. Наприкінці експерименту щурів забивали методом цервікальної дислокації під легким ефірним наркозом. Для аналізу використовували сироватку крові, лімфоцити, еритроцити, гомогенати печінки та нирок. Органи гомогенізували у ручному гомогенізаторі, після чого екстрагували [11]. Показники структурно-функціонального стану цитоплазматичних мембран гомогенатів тканин щурів, що отримували органічні суміші, оцінювали по інтенсивності спонтанної та індукованої H₂O₂ та FeCl₃, люмінолзалежної БХЛ. Зразки біологічного матеріалу термостатували у темновій камері при 37°C, після чого виміряли власну інтенсивність світіння сироватки крові і гомогенатів та індуковану перекисом водню, реєструючи спалахи світіння та кінетику реакції протягом 1,5-3 хвилин. Дослідження виконували на медичному біохемілюмінометрі БХЛМЦ 1-01. Перекисне

вести до виникнення структурно-метаболических порушень клітинної мембрани та функції клітини. Відомо, що більшість мембранних білків у разі пошкодження ліпідів втрачають ферментативну активність [8]. Тому для підтримання повноцінної функції мембранних інтегративних білків необхідне гідрофобне ліпідне оточення. Крім того, функціональна активність мембран визначається співвідношенням катаболічних та анаболічних процесів інтегративних білків, їх необхідною конформацією та розташуванням у відповідній послідовності, що забезпечує послідовне протікання метаболических реакцій. У цьому аспекті можна припустити, що підвищення кількості перекисів та гідроперекисів, пов'язане із збільшенням рівнів збуджених електронних станів, може впливати на процеси окислювальної модифікації білків цитоплазматичної мембрани. Таке припущення добре співвідноситься з отриманими результатами дослідження фосфоресценції сироватки крові щурів (табл. 2).

Таблиця 1
Динаміка БХЛ сироватки крові та гомогенатів органів щурів, що одержували органічні речовини у 1/100 LD₅₀ (M±m), (I⁰ – імп/с)

Вид БХЛ	Речовини			
	Контроль	ГдР	ГР “Роса”	ОР-40
Сироватка крові				
СХЛ	123,5±7,2	257,4±17,1*	248,8±16,8*	219,6±13,2*
ІХЛ (H ₂ O ₂)	129,5±14,9	1631,2±27,2*	1321,4±18,3*	1379,5±17,9*
ІХЛ (FeCl ₃)	653,6±11,9	1574,3±30,4*	1279,3±26,4*	1334,8±16,8*
Люмінолзалежна ІХЛ (H ₂ O ₂)	1791,2±17,3	4451,3±49,5*	3862,7±39,8*	3864,7±41,5*

Люмінолзалежна ІХЛ (FeCl ₃)	1618,4±23,7	4149,8±47,3*	3648,8±31,3*	3721,5±32,6*
Гомогенати печінки				
СХЛ	143,2±7,9	293,8±10,9*	265,8±12,1*	274,2±14,1*
ІХЛ (H ₂ O ₂)	798,9±12,1	1499,8±15,7*	1184,9±17,9*	1237,2±18,9*
ІХЛ (FeCl ₃)	795,5±14,9	1507,8±22,6*	1379,3±20,4*	1319,7±20,4*
Люмінолзалежна ІХЛ (H ₂ O ₂)	1823,6±16,8	3918,4±23,5*	3875,9±27,4*	3896,5±24,3*
Люмінолзалежна ІХЛ (FeCl ₃)	1746,8±20,5	3846,7±26,5*	3759,4±27,1*	3826,5±26,98*
Гомогенати нирок				
СХЛ	148,9±6,9	316,7±21,3*	288,6±18,4*	303,5±20,6*
ІХЛ (H ₂ O ₂)	858,7±10,94	1582,5±19,1*	1367,5±17,4*	1488,7±18,9*
ІХЛ (FeCl ₃)	809,6±9,8	1513,4±20,8*	1416,4±18,6*	1475,9±19,7*
Люмінолзалежна ІХЛ (H ₂ O ₂)	1868,7±21,5	4253,6±63,7*	3821,9±54,5*	4011,8±55,3*
Люмінолзалежна ІХЛ (FeCl ₃)	1757,8±29,6	4146,4±57,8*	3936,4±51,7*	3775,4±49,8*

* - різниця показників вірогідна, (p<0,05)

Таблиця 2

Динаміка фосфоресценції сироватки крові щурів, що отримували 1/100 LD₅₀ органічних сумішей (M±m), (імп/с)

Спектри збудження (λ)	Контроль	Речовини		
		ГдР	ГР	ОР-40
297	4248,6±68,7	4508,5±62,3*	4397,5±63,5*	4462,7±64,9*
313	3248,5±27,8	3858,9±40,7*	3579,9±31,6*	3704,6±33,2*
334	618,9±20,3	809,7±21,7*	786,8±19,7*	821,4±26,2*
365	1889,5±39,4	2009,6±32,0*	2115,7±25,3*	2124,6±29,4*
404	459,7±17,9	627,5±17,8*	609,4±18,3*	658,3±23,7*
434	609,6±14,8	827,5±21,3*	779,0±17,6*	836,8±16,3*

* - різниця показників вірогідна, (p<0,05)

Отримані дані свідчать про значне підвищення інтенсивності світіння сироватки крові, найбільш виражене під впливом коротких (λ=297-334) та довгих (λ=434) хвиль збудження, яке також співвідноситься із збільшенням кількості молекул у триплетному стані. Відомо, що молекули у збудженому електронному стані мають довгий час існу-

вання, а їх перехід на низькі незбуджені рівні відбувається дуже повільно [6] (табл. 3). Результати реєстрації фосфоресценції можуть свідчити про конформаційні зміни білкових молекул, наслідком яких є порушення структури та функції клітини, її дистрофічні зміни та виникнення гіпоксії [7].

Таблиця 3

Динаміка окислювальної модифікації білків під впливом 1/100 LD₅₀ органічних сумішей, сироватка крові, (M±m), (імп/с)

Речовини	Показники	
	2,4-дінітрофенілальдогідрозони (од. опт. густини/г білку, λ – 370 нм)	2,4-дінітрофенілкетогідрозони (од. опт. густини/г білку, λ – 380 нм)
Контроль	21,73±1,82	24,55±2,18
ГР	38,95±2,25*	43,76±1,54*
ГдР	39,41±2,17*	42,54±2,12*
ОР-40	39,82±2,19*	39,60±2,11*

* - різниця показників вірогідна, (p<0,05)

Визначене в усіх випадках підвищення рівнів 2,4-дінітрофенілальдогідрозонів та 2,4-діфенілкетогідрозонів підтверджує інтенсифікацію окислювальної модифікації білків клітинної мембрани, що дозволяє припустити спроможність органічних сумішей активувати як перекисне окиснення ліпідів, так і окислювальну модифікацію білків, які є провідною структурною одиницею рецепторного апарату. Тривалий вплив досліджуваних речовин, навіть у субтоксичних дозах, здатний порушувати структурно-функціональні властивості клітинної мембрани, внаслідок чого можуть виникати зміни внутрішньоклітинного метаболізму, дисбаланс

катаболічних та анаболічних процесів та функції мембранних білків [10]. Таким чином, дія органічних сумішей на організм спроможна викликати мембранну патологію, яка впливає на молекулярні механізми забезпечення оптимального метаболізму.

ВИСНОВКИ

1. Досліджувані органічні суміші у 1/100 LD₅₀ викликали інтенсифікацію БХЛ біологічних субстратів, що дозволяє припустити збільшення рівнів збуджених електронних станів, активізацію процесів ПОЛ та пошкодження ліпідів цитоплазматичної мембрани

2. Органічні речовини у 1/100 LD₅₀ стимулювали підвищення рівнів 2,4-дінитрофенілаля-догідрозонів, 2,4-діфенілкетогідрозонів, показників флюоресценції, (особливо коротко- та довгохвильового спектру), що співвідноситься з інтенсифікацією окислювальної модифікації білків клітинної мембрани.
 3. Отриманий фактичний матеріал свідчить про порушення структури білково-ліпідного шару цитоплазматичної мембрани та дозволяє припустити порушення її функції.
- Перспективою подальшого пошуку у даному напрямку є визначення полярності, текучості мембран, погруження білків у ліпідний шар, що дасть змогу уточнення порушень як структури, так і функції клітинної мембрани під впливом субтоксичних доз органічних сумішей на основі ПЕГ.

ЛІТЕРАТУРА

1. Фаллер Д.М., Шилдс Д. Молекулярная биология клетки / Руководство для врачей. Пер. с англ. - М.:Бином-Пресс. - 2003. - 272 с.
2. Рахманин Ю.А., Литвинов Н.Н. // Гигиена и санитария. - М.: Медицина. - № 6. - 2004. - С. 48-50.
3. Матюшин Б.Н., Логинов А.С. // Клини. лаб. диагностика. - 1996. - № 4. - С. 51-54.
4. Дубинина Е.Е., Бурмистрова Р.О., Хадиев Д.А., и др. // Вопросы мед. химии. - 1996. - Т. 41. - вып. 1. - С. 24-26.
5. Владимирев Ю.А., Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. - М.: Наука. - 1989. - 320 с.
6. Баглей Е.А., Недопитанская Н.Н. // Тези доп. I з'їзду токсикологів України / Під ред. Проданчука М.Г. - Київ. - 2001. - С. 50.
7. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма: метод. рекомендации. Под ред. проф. В.Х.Хавинсона. - СПб: ИПК «Фоллиант» - 2000. - 104 с.
8. Esterbauer H., Gebicki J., Puhl H., et al. // Free Rad. Biol. Med. - 1992. - №13. - P. 341-390.
9. Hellivell B., Gutteridge J.M.C. Free radicals in biology and medicine. - Oxford. - 1989. - 257 p.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОСТОЯНИЯ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН С ПОМОЩЬЮ МЕТОДОВ БИОХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ И ФОСФОРЕСЦЕНЦИИ

Е.В. Сиренко

Харьковская медицинская академия последипломного образования, Украина

РЕЗЮМЕ

Експериментально определены повышение уровней БХЛ, интенсификация фосфоресценции и повышение содержания 2,4-динитрофенилальдогидразонов и 2,4-динитрофенилкетогидразонов в биологических жидкостях и гомогенатах тканей органов белых крыс, которые получали субтоксические дозы органических смесей на основе ПЭГ на протяжении 45 суток. Полученные данные позволяют предположить способность исследуемых веществ повышать плотность белково-липидного слоя цитоплазматической мембраны, интенсифицировать свободнорадикальные процессы, перекисное окисление липидов и белков, изменять структуру и функцию клеточной мембраны, что отрицательно влияет на метаболизм.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: полиэтиленгликоли, клеточные мембраны, биохемилюминесценция, фосфоресценция

DEFINITION OF CONDITION CYTOPLASMATIC CELLULAR MEMBRANES WITH THE HELP OF METHODS BIOHEMILUMINESCENCE AND PHOSPHORESCENCE

E.V. Sirenko

Kharkov medical academy of postgraduate education, Ukraine

SUMMARY

Are experimentally determined increase of levels BHL, an intensification of a phosphorescence and increase of contents 2,4-dinitrophenylaldogidrasone and 2,4-dinitrophenylketogidrasone in biological liquids and tissue fabrics of bodies white rats which received subtoxic doses of organic mixes on basis PEG during 45 day. The received data allow to assume ability of researched substances to lift density белково-липидного a layer cytoplasmatic membranes, to intensify free-radical processes, липидов and fibers to change structure and function of a cellular membrane which negatively influences a metabolism

KEY WORDS: polietilenglycol, cellular membranes, biohemiluminescence, phosphorescence

УДК: 616.428-053.13/4-036.88-02: 618.3-06: 616.98:578.828.6]-091.8

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МЕЗЕНТЕРИАЛЬНЫХ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ ПЛОДОВ И НОВОРОЖДЕННЫХ ОТ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ МАТЕРЕЙ

И.В. Сорокина¹, С.А. Шерстюк²

¹Харьковский государственный медицинский университет, Украина

²Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, Украина

РЕЗЮМЕ

С целью выявления морфологических особенностей мезентериальных лимфатических узлов у плодов и новорожденных от ВИЧ-инфицированных матерей, был изучен лимфоидный компонент органа с использованием морфологических, иммуногистохимических и морфометрических методов. Выявлены морфологические признаки значительного нарушения функциональной активности Т-лимфоцитов и в меньшей степени угнетение популяции В-лимфоцитов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ВИЧ-инфекция, мезентериальные лимфатические узлы, лимфоциты

Мезентериальные лимфатические узлы являются периферической частью иммунной системы [5]. В них происходит антигензависимая пролиферация и дифференцировка В-лимфоцитов, с последующим образованием В-клеток памяти и антителопродуцирующих клеток в мезентериальных лимфатических узлах обеспечивает их эффективное взаимодействие в ходе иммунного ответа [10]. ВИЧ по своей природе в первую очередь является иммунотропным, поэтому иммунная система начинает играть все более активную роль в общем патогенезе заболевания. ВИЧ связывается с компонентом клеточной мембраны (CD4⁺) проникает через мембрану клетки и разрушает ее. Антиген CD4⁺ содержат: Т₄ – лимфоциты-хелперы, моноциты (макрофаги), дендритические антигенпредставляющие клетки лимфоидных органов и кожи, а также около 5% В-лимфоцитов [8], следовательно ВИЧ оказывает прямое влияние на морфологическую структуру мезентериальных лимфатических узлов.

В литературе имеются данные о морфологических изменениях органов дыхательной, пищеварительной, ЦНС при ВИЧ инфекции у детей [2]. Данные о влиянии ВИЧ инфекции матери на морфологическое состояние мезентериальных лимфатических узлов плодов и новорожденных в литературе не обнаружены.

Целью настоящего исследования явилось выявление морфологических особенностей мезентериальных лимфатических узлов у плодов и новорожденных от ВИЧ-инфицированных матерей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужили

плазматических клеток [9]. Среди Т-лимфоцитов в мезентериальных лимфатических узлах преобладают CD4⁺, а CD8⁺-клетки встречаются значительно реже [5]. Строго определенное взаимное расположение Т- и В-лимфоцитов, макрофагов, дендритных мертворожденные плоды и умершие новорожденные от ВИЧ-инфицированных матерей. Материал собирался с 1998 по 2006 г. в Харьковском перинатальном центре, Одесском и Днепропетровском патологоанатомических бюро. В исследуемую группу было отобрано 10 мертворожденных и 6 новорожденных от матерей с серологически подтвержденной ВИЧ-инфекцией. Для получения достоверных данных материал подбирался тщательно. Ни в одном из этих наблюдений не были зарегистрированы оппортунистические заболевания. Мертворожденные погибли вследствие острого нарушения пуповинно-плацентарного кровообращения (отслойка плаценты, обвитие пуповины вокруг различных частей тела плода) и родовой травмы. Новорожденные умирали вследствие постнатальной асфиксии и связанной с ней внутриутробной пневмонии. Группу контроля составили мертворожденные дети от здоровых матерей (12 случаев). Причиной смерти плодов явилось острое нарушение пуповинно-плацентарного кровообращения и родовые травмы. Срок гестации мертворожденных и новорожденных составил 36-40 недель.

Из мезентериальных лимфатических узлов вырезались кусочки из разных участков, которые подвергались стандартной парафиновой проводке, после чего изготавливались срезы толщиной 5-6 мкм. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Для определения