

УДК 612.017:577.115.4:577.121.7:615.356:577.161.3

К.Г.Гаркава, Г.Б.Афоніна, О.В.Задоріна, Т.С.Брюзгіна

Вплив лімфоцитарного кейлону на функційну активність лімфоцитів при антиоксидантній недостатності та корекції її вітаміном Е

Изучали активность лимфоцитарного кейлона — тканеспецифического ингибитора клеточной пролиферации и его влияние на иммунокомпетентные клетки при антиоксидантной недостаточности (АОН) и коррекции ее витамином Е. Установлено, что количество лимфоцитарного кейлона при АОН увеличивалось в 2 раза по сравнению с контрольными значениями и сохранялось на таком же уровне при использовании α-токоферол ацетата. Ингибирующая активность кейлона сохранялась в отношении пролиферативной активности лимфоцитов и исчезала относительно синтеза ДНК иммунокомпетентными клетками. Изучение спектра жирных кислот фосфолипидов мембран лимфоцитов показало, что лимфоцитарный кейлон нормализовал содержание ненасыщенных жирных кислот, что позволяет сделать вывод об антиоксидантных свойствах лимфоцитарного кейлона.

Вступ

Кейлони як поліфункційні сполуки беруть участь не тільки у регуляції метаболізму та діленні клітин і їх диференціюванні, а також у формуванні тканинного рівня організації та забезпеченні тканинного гомеостазу [2]. При антиоксидантній недостатності (АОН) відбувається зниження рівня клітинної проліферації, порушується розмноження та диференціювання клітин [1, 4, 7]. Класичним прикладом АОН є α-токоферолова недостатність, прояв якої — підсилення перекисного окислення мембранних ліпідів, що призводить до пошкодження клітинних і субклітинних мембран та їх проникливості [3, 5].

Підвищення перекисного окислення ліпідів при Е-авітамінізмі спричинює зміну фізико-хімічних і функційних властивостей мембран імунокомпетентних клітин, на рівні яких пізнаються не тільки антиген, мітоген, але й формується сигнал, що включає відповідну реакцію клітин [19]. При авітамінізмі спостерігається пригнічення розмноження та диференціювання імунокомпетентних клітин, гальмування фагоцитозу, зменшується число антитілоутворюючих клітин та антитіл. Знижується рівень проліферації лімфоцитів на фітогемаглютиніні (ФГА), зменшується активність природних кілерів. Вітамін Е виявляє стабілізуючу дію на фазовий стан ліпідного бішару мембран клітин, який зумовлює рухливість рецепторів, їх експресію та функцію [9, 16]. Вітамін Е відіграє важливу фізіологічну роль у функціонуванні імунної системи. Так, при введенні вітаміну Е збільшувалась абсолютна та відносна кількість Т-лімфоцитів, маса тимуса збільшувалася, а селезінки не змінювалася. Активізувалися природні кілери, збільшувалося число антитілоутворюючих клітин, але число лейкоцитів і лімфоцитів, вміст В-лімфоцитів не змінювалися [12, 13, 14].

У зв'язку з тим, що гомеостаз імунної системи на рівні лімфоїдної тканини здійснюється лімфоцитарними кейлонами — ендogenousними тканинноспецифічними інгібіторами клітинної проліферації, який має поверхньомембранне походження, метою наших досліджень було вивчити функціональну активність лімфоцитарного кейлону і його вплив на імунокомпетентні клітини при АОН і корекції її вітаміном Є.

Методика

Досліди проводили на 40 щурах-самцях масою 160—180 г, на яких відтворювали АОН, використавши модель Є-авітамінозу [21]. Для цього тварин було розділено на 3 групи. До I групи (контрольної) ввійшли тварини, які отримували протягом 2-х місяців казеїнову діету з добавкою вітамінів А, Д, Є. Щури II групи впродовж усього досліджу вітаміну Є не отримували (стан АОН). Тваринам III групи для корекції АОН вводили α-токоферол-ацетат (50 мг/кг) протягом 4-х діб до забою. Через 1 діб після останнього введення вітаміну Є тварин забивали цервікальною дислокацією під легким ефірним наркозом.

Функціональну активність імунокомпетентних клітин дослідних тварин оцінювали в реакції бласттрансформації лімфоцитів (РБТЛ) на ФГА за стандартною методикою з ³Н-тимідином, обчислюючи індекс підсилення (ІП) РБТЛ за формулою:

$$\frac{a - b}{a} \cdot 100\%$$

де а — число імпульсів за 1 хв у дослідних пробах, б — у контрольних пробах [18].

Метаболічну активність лімфоцитів визначали методом флуоресційного зондування у відбитках селезінки за коефіцієнтом Ріглера (індекс α) при довжині хвилі 640—530 нм на мікроцистоспектрофлуориметрі на базі мікроскопа ЛЮМАМ-3. Індекс α — це відношення РНК/ДНК, що характеризує рівень синтезуючих процесів у лімфоцитах [10]. Як флуоресційний зонд використовували акридиново-оранжевий у співвідношенні 1:30000 на цитратфосфатному буфері. Число Т- і В-лімфоцитів оцінювали методом Е-і ЕАС-розеткоутворення [17].

Із селезінки дослідних щурів за методом Bullough [20] виділяли кейлон, активність якого оцінювали методом флуоресційного зондування лімфоцитів після впливу кейлону. Метод дозволяє виявити структурнофункціональний стан хроматину лімфоцитів після впливу останнього, оскільки ступінь адсорбції акридиново-оранжевого на ДНК-хроматині буде різна в дослідних і контрольних пробах. Різниця значень інтенсивності флуоресценції контрольних і дослідних проб поділена на значення інтенсивності контрольної проби і виражена в умовних одиницях, характеризує флуоресценцію дослідного зразка. Інтенсивність флуоресценції надосадкової рідини дослідних і контрольних проб вимірювали на спектрофлуориметрі MPF-4 фірми «Hitachi» (Японія) при довжині хвилі 530 нм (460 нм — збудження) [6]. На 30 безпородних мишах масою 18—20 г вивчали вплив кейлону на проліферативну активність лімфоцитів на моделі антитілоутворення, на антиген-еритроцитах барана. Через 5 діб тварин декапітували під легким ефірним наркозом і оцінювали імунну відповідь за числом антитілоутворюючих клітин (АУК) [22]. Склад жирних кислот у мембранних фосфоліпідах лімфоцитів визначали методом газорідинної хроматографії. За цим методом отримували суспензію лімфоцитів, із яких шляхом хлороформ-метанольної екстракції добували ліпіди і есте-

рифікували їх з 5 мл 1,5 %-ї сірчаної кислоти у метанолі. Потім екстрагували жирні кислоти сумішшю гексан-ефіру, випаровували в потоці азоту при 45 °С, розчиняли в гексані й аналізували на газовому хроматографі «Цвет-164» з полум'яно-іонізаційним детектором в ізотермічному режимі. Піки метилових ефірів жирних кислот вимірювали нормуванням площ і розраховували їх вміст у відсотках [15]. Вірогідність результатів оцінювали за допомогою критерію t Стьюдента.

Результати та їх обговорення

Результати показали, що при АОН мітогеніндуковане включення ³H-тимідину в ДНК лімфоцитів вірогідно зменшувалося (табл. 1). Знижувалася метаболічна активність лімфоцитів. Індекс α достовірно зменшувався в 2 рази. Вірогідно зменшувалося число Т-лімфоцитів, порушувалася проліферативна та їх функціональна активність. Кількість лімфоцитарного кейлону, вилученого із селезінки щурів з АОН при корекції вітаміном Є свідчить, що продукція його збільшувалася порівняно з контролем у 2 рази і не змінювалася за умов використання α -токоферолу ацетату. Підвищена продукція лімфоцитарного кейлону при АОН і при корекції її, а також нормалізація реакції бластної трансформації при використанні вітаміну Є, вказує, що стабілізація фазового стану ліпідного бішару мембран клітин під

Таблиця 1. Функціональна активність імунокомпетентних клітин у щурів із антиоксидантною недостатністю і за умов корекції вітаміном Є (M \pm m)

Умова досліду	Індекс підсилення бласт-трансформації лімфоцитів	Індекс α (відношення РНК/ДНК)	Кількість кейлону, мкг/мг	Кількість, %	
				Е-розеткоутворюючих клітин	ЕАС-розеткоутворюючих клітин
Казеїнова дієта з вітамінами А, Д, Є (контроль)	52,6 \pm 4,03	0,47 \pm 0,03	10,0 \pm 0,2	37,6 \pm 4,43	26,6 \pm 2,16
Казеїнова дієта з вітамінами А, Д	27,5 \pm 4,01*	0,24 \pm 0,005*	20,0 \pm 0,3*	29,2 \pm 4,08	24,0 \pm 2,9
Казеїнова дієта з вітамінами Є	50,4 \pm 6,39	0,43 \pm 0,02	20,0 \pm 0,4*	40,1 \pm 4,14	26,7 \pm 2,05

* Тут і в табл. 3 результати вірогідні порівняно з контролем P<0,05.

Таблиця 2. Активність лімфоцитарного кейлону, виділеного із селезінки щурів із антиоксидантною недостатністю і при корекції вітаміном Є

Умова досліду	Кількість антитілоутворюючих клітин селезінки $\times 10^6$	Відсоток інгібіції антитілоутворюючих клітин	Відсоток інгібіції синтезу ДНК
Казеїнова дієта з вітамінами А, Д, Є (контроль)	33,0 \pm 3,2	43 %	50 %
Імунізація еритроцитами барана (контроль II)	18,9 \pm 2,5**	—	—
Казеїнова дієта з вітамінами А, Д	11,5 \pm 1,04**,*	66 %	—

Таблиця 3. Склад жирних кислот у плазматичних мембранах лімфоцитів щурів з антиок-

Умова дослідю	Відносний вміст			
	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
Казеїнова дієта з вітамінами А, Д, Е	28,6±1,4	13,4±1,2	41,1±1,4	16,9±1,3
Казеїнова дієта з вітамінами А, Д	35,2±1,6	15,5±1,9	35,3±1,7*	13,9±1,2
Казеїнова дієта з вітаміном Е	34,6±1,7	19,2±1,3	29,6±1,4*	16,7±1,3
Казеїнова дієта з екзогенним кейлоном	32,8±1,8	14,4±1,1	36,0±1,2*	0,8±0,02
Казеїнова дієта з вітаміном Е і екзогенним кейлоном	31,8±1,7	15,3±1,6	38,4±2,1	14,5±0,8
Казеїнова дієта з ендогенним кейлоном	31,1±1,5	15,1±1,2	39,8±1,9	14,0±0,8
Казеїнова дієта з вітаміном Е і ендогенним кейлоном	32,7±1,3	12,9±0,8	43,2±2,1	10,9±0,6

Примітка. C16:0 — пальмітинова; C18:0 — стеаринова; C18:1 — олеїнова; C18:2 — лінолева;

дією вітаміна Е частково нормалізує функцію лімфоцитів. Продукція лімфоцитарного кейлону — ендогенного інгібітора клітинної проліферації залишалася ще підвищеною. Вивчення активності кейлону по відношенню ДНК-синтезуючої та проліферативної здатності лімфоцитів показало, що кейлон із селезінки щурів з АОН і за умов використання вітаміну Е, не пригнічував синтез ДНК у лімфоцитах, у той час, як кейлон контрольних тварин знижував синтез ДНК на 50 %. Кейлон дослідних тварин, де використовували вітамін Е, інгібував число АУК у селезінці на 66 % і на 54 %, відповідно. Можливо в отриманому препараті міститься G₂-кейлон, який діє на премитотичну фазу клітинного циклу лімфоцитів і відсутній G₁-кейлон, котрий діє на пресинтетичну фазу. Можливо дія останнього блокована внаслідок його інактивації, або за рахунок дії антикейлону (табл. 2).

Спостерігається негативно-зворотний зв'язок активності кейлону з активністю клітин до бласттрансформації (див. табл. 1), що вказує на взаємодію між клітинними рецепторами до кейлону і ФГА [11]. Чим більше рецепторів до кейлону і сильніше проявляється його інгібіційна активність, тим менше рецепторів до ФГА, відповідно менше клітин бере участь у проліферації.

Оскільки функціональний стан мембран пов'язаний з жирнокислотним складом їх фосфоліпідів, вивчення впливу ендогенного та екзогенного кейлону на жирнокислотний склад лімфоцитів контрольних і дослідних тварин показує, що лімфоцитарний кейлон в дослідях *in vitro* змінював склад насичених жирних кислот (НЖК) і ненасичених (ННЖК). Так, у контрольних тварин кількість насичених жирних кислот була 42,0 %, а ненасичених — 58,0 %. При АОН кількість ННЖК вірогідно зменшувалася. Використання вітаміну Е не викликало достовірних змін у складі НЖК і ННЖК порівняно з тваринами з АОН. Із всього спектру жирних кислот помітно змінювався вміст олеїнової кислоти (C_{18:1}). При АОН, а також при використанні вітаміну Е і екзогенного лімфоцитарного кейлону вміст C_{18:1} був вірогідно нижчий ніж у контролі, а в інших групах наближувався до норми. Використовуючи *in vitro*, екзогенний і ендогенний лімфоцитарний

сидантною недостатністю і за умов використання вітаміну Є та кейлону ($M \pm m$)

жирних кислот (%)			Коефіцієнт насиченості жирних кислот (насичена жирна кисло- та/ ненасичена жирна кислота)
C20:4	Сума насичених жирних кислот	Сума ненасичених жирних кислот	
сліди	42,0±1,6	58,0±1,7	0,84
0,3±0,03	50,7±0,9*	49,5±1,7*	1,02
сліди	53,8±2,0	46,3±1,2*	1,16
16,0±1,0	47,2±1,4*	52,8±2,1	0,89
сліди	47,1±1,4*	52,9±2,3	0,89
сліди	46,2±1,2	53,8±2,1	0,86
0,4±0,01	45,6±1,8	54,5±2,3	0,84

C20:4 — арахідонова кислоти.

кейлон, було помічено, що жирнокислотний склад лімфоцитів змінювався в бік зниження насичених. Відношення НЖК до ННЖК наближалось до норми (табл. 3).

Таким чином, при використанні вітаміну Є продукція лімфоцитарного кейлону залишалася підвищеною. За цих умов реєструвалася збільшена інгібуюча активність лімфоцитарного кейлону по відношенню до проліферативної активності лімфоцитів і зникала активність по відношенню до синтезу ДНК. За наслідками газорідинної хроматографії ліпідного комплексу мембран лімфоцитів було з'ясовано, що лімфоцитарний кейлон нормалізує спектр жирних кислот лімфоцитарних мембран, що дозволяє зробити висновок про антиоксидантні властивості лімфоцитарного кейлону.

E.G.Garkavaya, G.B.Afonina, O.V.Zadorina, T.S.Bryuzgina

LYMPHOCYTE CHALONE EFFECT ON FUNCTIONAL ACTIVITY OF LYMPHOCYTES IN ANTIOXIDANT INSUFFICIENCY AND ITS CORRECTION WITH VITAMIN E

Activity of lymphocyte chalone-tissue-specific inhibitor of cell proliferation and its effect on immunocompetent cells in antioxidant insufficiency (AOI) and its correction with vitamin E were studied in the work. It was stated that lymphocyte chalone quantity in AOI increased 2 times as compared with control values and was at the same level when using α -tocopherol acetate. The inhibiting activity of chalone was preserved in relation to the proliferative activity of lymphocytes and disappeared in relation to DNA-synthesis with immunocompetent cells. The study of fatty acids spectrum of lymphocyte membrane phospholipids has shown that lymphocyte chalone normalized the content of saturated and unsaturated fatty acids that demonstrates the antioxidant properties of lymphocyte chalone.

O.O.Bogomolets Ukrainian Medical University
Ministry of Public Health of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Алесенко А.В. Метаболизм липидов в процессах клеточного деления. Биоантиоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте. — М.: Наука, 1975. — С. 142—171.
2. Бала Ю.М. Антикейлоны и кейлоны. — Воронеж, 1984. — 250 с.
3. Блажевич Н.В. Витамин Е. Методы оценки и контроля витаминной обеспеченности населения / Под ред. В.Б.Спиричева. — М.: Наука, 1984. — С. 42—48.
4. Бурлакова Е.Б. Роль природных антиоксидантов в регуляторных процессах. Биоантиоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте. — М.: Наука, 1975. — С. 172—198.
5. Воскресенский О.Н., Левещкий А.П. Перекиси липидов в живом организме // Вопросы мед. химии. — 1970. — 16, № 6. — С. 563—583.
6. Гаркавая Е.Г., Данова И.В. Флюоресцентное зондирование для оценки эффективности иммуномодуляторов // Мат. I Респ. конф.: Новые физические методы в медицине. — Ворошиловград, 1990. — С. 244—245.
7. Губский Ю.И. Молекулярные механизмы повреждения мембран гепатоцитов при экспериментальном поражении печени: Автореф. дис. ... д-ра. мед. наук. — К., 1983. — 472 с.
8. Иванов И.И., Тарусов Б.Н. Молекулярные механизмы действия токоферола. Свободнорадикальное окисление липидов в норме и патологии. — М.: Наука, 1976. — С. 105—108.
9. Иakov В.Г., Берестовский Г.Н. Липидный бислой биологических мембран. — М.: Наука, 1982. — 224 с.
10. Карнаухова В.Н., Карнаухова Н.А., Яшин В.А. Методы и техника люминесцентной цитодиагностики. — Пушкино: ОНТИНЦБИАН СССР, 1983. — С. 33—43.
11. Неустроев Г.В. Роль кейлонов в регуляции пролиферативной активности клеток костного мозга, слюнных желез, тимуса. Автореф. дис. ... д-ра. мед. наук. — М., 1982. — 46 с.
12. Плещитый К.Д., Сухих Г.Т., Давыдова Т.В., Блажевич Н.В., Спиричев В.Ю. Показатель специфического и неспецифического иммунитета при различной обеспеченности крыс витамином Е // Вопросы мед. химии. — 1981. — 27, № 5. — С. 669—672.
13. Плещитый К.Д., Сухих Г.Т., Давыдова Т.В. Влияние витамина Е на содержание Т- и В-лимфоцитов в периферической крови и некоторые показатели неспецифической резистентности // Вопросы питания. — 1984. — № 4. — С. 42—44.
14. Плещитый К.Д. О влияние витамина Е на иммунный ответ // Иммунология. — 1985. — № 2. — С. 72—73.
15. Процок Р.Г., Брюзина Т.С., Кравченко Э.Я. Газохроматографическое определение жирно-кислотного состава фосфолипидов сурфактанта легких // Лаб. дело. — 1986. — № 6. — С. 342—343.
16. Скрипник В.И., Ерин А.Н., Братковская Л.Б., Каган В.Е. α -токоферол — модификатор фазового состояния липидного бислоя // Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 1984. — 98, № 12. — С. 673—675.
17. Фримель Г. Иммунологические методы. — М.: Медицина, 1987. — С. 294—302.
18. Харкевич Д.Д., Карагидзе З.Г. Влияние стимуляции опиоидных рецепторов на функциональную активность лимфоцитов // Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 1989. — 108, № 9. — С. 315—316.
19. Шестакова С.В., Свитковский М.В., Брусованик В.И., Котелевцев С.В., Козлов Ю.П. Трансмембранные механизмы активации лимфоцитов // Иммунология. — 1982. — № 2. — С. 19—22.
20. Bullough W.S., Hewet C.L., Lawrence E.H. The epidermal chalone: a preliminary attempt at isolation // Exp. Cell. Res. — 1964. — 36, № 1. — P. 192—200.
21. Edwin E.E., Diplock A.T., Bunyan J., Green J. Studies on vitamin E. The distribution of vitamin E in the rat and the effect of α -tocopherol and dietary selenium on ubiquinone and ubiquinolenol in tissues // Biochem J. — 1961. — 79, № 1. — P. 91—105.
22. Jerne N.K., Nordin A.A. Plaque formation in agar by single antibodyproducing cells // Science. — 1963. — 140, № 3565. — P. 405—412.

Укр. мед. ун-т ім. О.О.Богомольця
М-ва охорони здоров'я України, Київ

Матеріал надійшов
до редакції 01.04.94