

УДК 612.014.464:612,438:577.15]-092.9

## ПОТРЕБЛЕНИЕ КИСЛОРОДА ТИМОЦИТАМИ КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА В УСЛОВИЯХ ИНГИБИРОВАНИЯ ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ

Никитина И. А., Грищук А. И.

Учреждение образования  
«Гомельский государственный медицинский университет»  
г. Гомель, Республика Беларусь

### *Введение*

Химические свойства кислорода явились причиной того, что уже на ранних этапах эволюции жизни возникли механизмы не только защиты от оксидантного повреждения биологических структур, но и для использования этого вещества в процессах энергетического метаболизма. Эукариоты в первую очередь используют кислород в качестве конечного акцептора электронов в процессах митохондриального и микросомального окисления. В тоже время высокоэффективная митохондриальная энергетика сопряжена с возрастанием риска образования активных форм кислорода (АФК) и азота (АФА) и развитием, связанных с ними, перекисных процессов. Нарушение механизмов контроля уровня АФК в клетке, обусловленное дисрегуляцией окислительно-восстановительного баланса тканей, является, по мнению некоторых авторов [2] одной из главных причин развития возрастной патологии.

Клетки постоянно подвергаются действию окислительного стресса, о чем свидетельствует наличия в организме продуктов взаимодействия АФК и АФА с макромолекулами. Это, в свою очередь, влечет за собой истощение активности системы антиоксидантной защиты, ее ферментативного и неферментативного звеньев. Показано, что суммарная активность ферментативных антиоксидантов в пересчете на белок ткани хорошо коррелирует со средней продолжительностью жизни млекопитающих. В связи с чем, дополнительное введение в организм веществ, способных перехватывать и нейтрализовать АФК (витамин Е, мелатонин, хелатные агенты и некоторые синтетические антиоксиданты) увеличивают продолжительность жизни дрозофил, лабораторных мышей, крыс и др. животных [5]. Анализ работ по возрастным вариациям компонентов антиоксидантной защиты у человека и животных показал, что в органах и тканях, не затронутых какой-либо возрастной патологией, активность СОД и других антиоксидантных систем при старении снижается, по крайней мере в очень старом возрасте. По мнению некоторых авторов, степень выраженности окислительного стресса является надежным маркером старения [6]. Транскрипционный блок генов многих антиоксидантных ферментов снижает устойчивость животных к прооксидантным воздействиям и сокращает продолжительность их жизни. Наиболее весомым аргументом в пользу связи показателей ферментативной антиоксидантной защиты и продолжительности жизни является наличие выраженной корреляции между ними у трансгенных животных. Было показано, что у мышей с нокаутом по Мп-СОД существенно сокращается продолжительность жизни, в то время как введение имитаторов СОД и каталазы, восполняющее дефицит активности Мп-СОД, вызывало увеличение продолжительности жизни в 2–3 раза по сравнению с нокаутированными животными [0]. До сих пор не обнаружено прямой корреляции между активностью отдельных антиоксидативных ферментов и продолжительностью жизни, что оставляет открытым вопрос о влиянии возраста на степень выраженности перекисных процессов в клетках.

### *Цель исследования*

Анализ уровня потребления кислорода в интактных и обработанных пероксинитритом тимоцитах животных разного возраста в условиях полного ингибирования тканевого дыхания.

### Материалы и методы исследования

Исследования проводилась на белых беспородных крысах-самцах. В эксперименте использовались животные трех разновозрастных групп по десять особей в каждой. В исследованиях использовались животные 3-месячного, 8-месячного и двухлетнего возраста. Трехмесячный возраст соответствует периоду полового созревания и максимуму развития тимуса, а для животных старших возрастных групп характерно наличие возрастных изменений различной степени выраженности. Определение концентрации кислорода в исследуемых образцах, проводили с помощью закрытого платинового электрода Кларка и компьютеризированной установки Record 4 (ИТЭБ РАН, Пущино, Россия). Скорость поглощения кислорода тимоцитами выражали в нмоль кислорода за 1 мин на  $10^7$  клеток, количество которых подсчитывали в камере Горяева. В экспериментах мы стремились к тому, чтобы число тимоцитов в ячейке было в пределах  $1-5 \times 10^7$  клеток, поскольку известно о зависимости между количеством клеток в ячейке и скоростью поглощения кислорода, одной клеткой L. Pachman [3]. Выделение тимоцитов осуществлялось стандартным методом.

Клеточные мембраны выделенных тимоцитов предварительно пермеабилizировали, добавляя в ячейку 2 мМ дигитонина с последующей инкубацией в течении 3 мин., что увеличивает их проницаемость для используемых субстратов. Долю митохондриального окисления в общем дыхательном процессе оценивали путем ингибирования цитохромоксидазы азидом натрия [4], при этом добиваясь максимального снижения скорости потребления кислорода и внося в полярографическую ячейку 4–5 порциями (титрометрически) по 3 мкл 1 М раствор ингибитора. Разница между  $V_{\text{энд}}$  и азидрезистентным дыханием составляет митохондриальное дыхание.

### Результаты и их обсуждение

Исследования показали, что общее потребление кислорода тимоцитами разновозрастных крыс колеблется в пределах 7,0–8,4 нмоль  $O_2$ /мин на  $10^7$  клеток и не имеет возрастной зависимости ( $p = 0,4214$  тест ANOVA Краскела-Уоллиса) (рисунок 1).

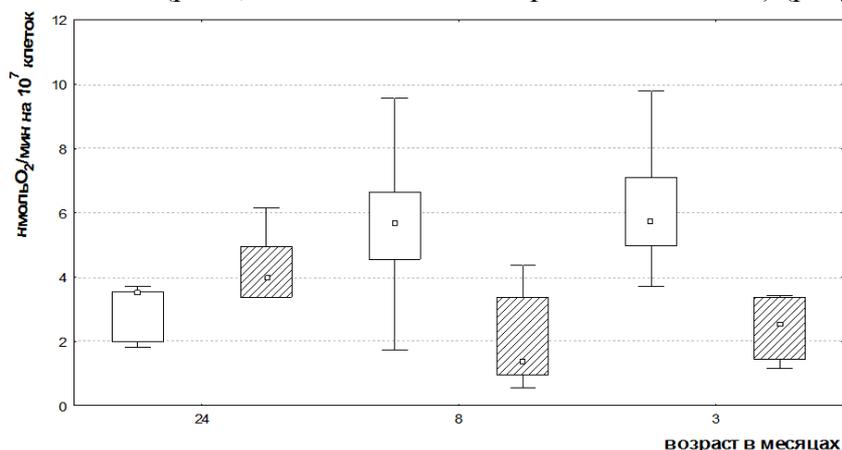


Рисунок 1 — Скорость потребления кислорода тимоцитами животных разного возраста  
— в процессах тканевого дыхания  
— в условиях ингибирования дыхательной цепи митохондрий.

Ингибирование цитохромоксидазы азидом натрия полностью блокирующее митохондриальное дыхание позволяет оценить преимущественно интенсивность перекисных процессов, поскольку активность другого кислородзависимого процесса — микросомального окисления в иммунокомпетентных клетках незначительна. В тоже время необходимо отметить, что азид натрия ( $NaN_3$ ) повышает восстановленность комплексов I и III и усилению ими продукцию АФК.

Уровень митохондриального (азидчувствительного) дыхания тимоцитов крыс (рисунк 1), в отличие от общего потребления кислорода, характеризуется возрастной зависимостью ( $p < 0,05$  тест ANOVA Краскела-Уоллиса). Необходимо отметить, что если у трех и восьмимесячных крыс этот показатель составляет более 70 % от всего утилизируемого тимоцитами кислорода, то у 2-летних крыс потребление кислорода митохондриями снижается практически на 50 % по сравнению с более молодыми животными. Это может свидетельствовать о снижении активности дыхательной цепи митохондрий, а также системы антиоксидантной защиты тимоцитов и, в конечном итоге, способствовать развитию возрастной иммунодепрессии. Таким образом, значимые различия параметров тканевого дыхания наблюдаются в тимоцитах двухлетних животных, при их сравнении как с трех- так и с восьмимесячными животными ( $p < 0,05$ , критерий Манна-Уитни). Снижение интенсивности митохондриального дыхания тимоцитов 2-летних крыс сопровождается стимуляцией азидрезистентного дыхания, что отражает увеличение утилизации кислорода в перекисных процессах до 60, против 30 % у молодых животных. Полученные данные хорошо согласуются с теорией, предложенной в 50-х годах прошлого века D. Hartman и Н. М. Эммануэлем [1], согласно которой, возрастное накопление повреждений различных клеточных структур, развитие дисфункций и формирование возрастной патологии обусловлено избыточным образованием в клетках активных форм кислорода (АФК), обладающих в норме регуляторной активностью.

#### **Заключение**

Интенсивность митохондриального дыхания тимоцитов с возрастом, особенно на начальных этапах возрастной инволюции тимуса, меняется незначительно и лишь у старых животных наблюдается существенное снижение активности дыхательной цепи и стимуляция перекисных процессов.

#### **ЛИТЕРАТУРА**

1. Анисимов, В. Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения / В. Н. Анисимов. – СПб Наука, 2003. — С. 386.
2. Dröge, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function / W. Dröge // *Physiol. Rev.* — 2002. — Vol. 82, № 1. — P. 47–95.
3. Pachman LNT. The carbohydrate metabolism and respiration of isolated small lymphocytes: In vitro studies of normal and phytohemagglutinin stimulated cells. *Blood.* — 1967. — Vol. 30. — P. 691–706.
4. Mitochondrial Pathways and Respiratory Control. 2 edition / Edited by Gnaiger E. — Innsbruck: OROBOROS MiPNet Publications, 2008. — 96 p.
5. Cutler, R. G. Oxidative stress and aging: catalase is a longevity determinant enzyme / R. G. Cutler // *Rejuvenation. Res.* — 2005. — Vol. 8. — P. 138–140.
6. Кольтовер, В. К. Свободнорадикальная теория старения и антиоксиданты: ревизия / В. К. Кольтовер // Тез. докл. XX съезда Физиологического общества им. И.П. Павлова, 4–8 июня 2007 г. — М., 2007. — С. 78.
7. Melov, S. Lifespan extension and rescue of spongiform encephalopathy in superoxide dismutase 2 nullizygous mice treated with superoxide dismutase-catalase mimetics / S. Melov // *J. Neurosci.* — 2001. — Vol. 21. — P. 8348–8353.

**УДК 616.72-018.3:577.3]:616.72-008.8**

## **МЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ГИАЛИНОВОГО ХРЯЦА В РАЗЛИЧНЫХ ЖИДКИХ СРЕДАХ**

**Николаев В. И., Ермаков С. Ф., Суслов А. А.**

**Учреждение образования**

**«Гомельский государственный медицинский университет»**

**Государственное научное учреждение**

**«Институт механики металлополимерных систем**

**им. В.А. Белого НАН Беларуси»**

**г. Гомель, Республика Беларусь**

#### **Введение**

Гиалиновый хрящ является одной из составляющих синовиальной среды суставов. Благодаря взаимодействию и взаимозависимости элементы суставной среды (синовиальная оболочка, синовиальная жидкость и суставной хрящ) способны создавать опти-