

ЛИТЕРАТУРА

1. Osteogenesis Imperfecta. A Translational Approach to Brittle Bone Disease / J. R. Shapiro [et al.]. — Academic Press, 2014. — 516 p.
2. Мизерницкий, Ю. Л. Современные методы оценки состояния бронхолегочной системы у детей / Ю. Л. Мизерницкий, С. Э. Цыпленкова, И. М. Мельникова. — М.: Медпрактика, 2012. — 176 с.
3. Метод применения бисфосфонатов в лечении детей с несовершенным остеогенезом: инструкция по применению: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 06.03.2014 г. — Минск, 2014. — 30 с.
4. Комплексное исследование респираторной функции легких в клинической практике: учеб.-метод. пособие / Е. И. Давидовская [и др.]. — Минск: БелМАПО, 2012. — 55 с.
5. Ляликов, С. А. Центильные характеристики антропометрических и лабораторных показателей у детей в современный период: инструкция по применению: утв. М-вом здравоохр. Респ. Беларусь 10.04.2009 / разработ. С. А. Ляликов, А. В. Сукало, О. Е. Кузнецов. — Гродно, 2009. — 94 с.

УДК 576.311.347:616-008.853.2-092.9

ВЛИЯНИЕ ПЕРОКСИНИТРИТА НА ДИНАМИКУ АДГЕЗИИ ТИМОЦИТОВ КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА ПРИ ИНГИБИРОВАНИИ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ МИТОХОНДРИЙ

Никитина И. А., Грищук А. И., Громыко М. В.

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

Введение

Вилочковая железа (тимус) играет важную роль в формировании Т-клеточной системы иммунитета и развитии возрастной иммунодепрессии, ассоциируется с дегенеративными процессами, связанными с образованием активных форм кислорода (АФК) и азота (АФА). Их действие приводит к накоплению в тканях, главным образом, белков, а также липидов, ДНК и других молекул, подвергнутых химической окислительной модификации [1, 2]. С возрастом механические свойства поверхностного слоя клеток иммунной системы претерпевают существенные изменения. Это обусловлено комплексом физико-химических и биохимических процессов, протекающих в условиях усиления окислительного стресса, являющегося надежным маркером старения [3]. Тимоциты как и остальные клетки иммунной системы очень чувствительны к окислительному стрессу, вызываемому действием АФК и АФА [4]. Введение в среду клеточной инкубации пероксинитрита — сильного окислителя — может привести к более сильному изменению механических свойств поверхностного слоя клеток, состоящего из белков цитоскелета, клеточной мембраны и гликокаликса.

В течение жизненного цикла клетки многоклеточного организма, включая и клетки иммунной системы, изменяют свою форму и размеры, делятся и направленно перемещаются [5]. Адгезия и распластывание входят в ряд наиболее важных фундаментальных, интегральных и энергозатратных функций клеток эукариот и осуществляются при активном участии цитоскелета [5, 6, 7]. В связи с этим параметры адгезии — интегральные клеточные параметры — могут быть критериями оценки как функционального состояния цитоскелета, так и энергетического метаболизма клетки.

Цель

Оценить влияние пероксинитрита на динамику процессов адгезии тимоцитов крыс разного возраста.

Материал и методы исследования

Для световой микроскопии использовали предметные стекла стандартного размера. Предварительно предметные стекла протирали этиловым спиртом, промывали дистиллированной водой и высушивали.

Тимоциты выделяли из белых крыс-самцов следующих возрастных групп (3-месячные — ювенильный возраст, 8-месячные — молодой возраст и 24-месячные — старческий возраст). Тимоциты ресуспендировали в фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем ионы кальция (0,3–1,0 мМ). Для подготовки образцов к световой микроскопии несколько капель суспензии кле-

ток помещали на обезжиренное предметное стекло и инкубировали при комнатной температуре. После периода инкубации клетки подвергали химической фиксации 1 %-ном глутаровым альдегидом в течение 20 минут. После химической фиксации образцы клеток однократно промывали в фосфатном буфере и троекратно в дистиллированной воде, окрашивали по Романовскому-Гимзе и высушивали на воздухе при комнатной температуре. Микрофотографии клеток, полученные при увеличении $\times 100$, сохраняли в цифровом формате с использованием программы «Морфотест» (MorphoTest). Анализ полученных изображений проводили с использованием программы ImageJ.

Результаты исследования и их обсуждение

Количественную оценку способности тимоцитов к адгезии и распластыванию давали, основываясь на изменении среднего диаметра тимоцитов, инкубированных на стекле за определенное время (время адгезии).

Установлено, что у тимоцитов ювенильных животных с увеличением времени адгезии возрастает их средний диаметр и, соответственно, площадь контакта клетки с подложкой (таблица), достигая максимума на 120-й минуте. Дальнейшее увеличение времени контакта клеток со стеклом ведет к снижению среднего диаметра тимоцитов. Подобная динамика характерна также и для эпителиальных клеток [8] и связана, по мнению авторов, с необходимостью дополнительного синтеза элементов цитоскелета и поверхностных структур клетки, участвующих в адгезии клетки.

При адгезии тимоцитов молодых крыс диаметр клеток достигает максимальных значений в течение первых 30 мин и практически не меняется на протяжении последующих 1,5 ч, а уменьшение диаметра начинается спустя 120 мин от начала адгезии. У тимоцитов 2-летних животных время достижения максимального диаметра также составляет 30 мин, после чего диаметр клетки начинает уменьшаться.

Увеличение площади контакта тимоцитов ювенильных крыс со стеклом на протяжении 120 мин от начала адгезии свидетельствует о более активной перестройке их цитоскелета, по сравнению с таковой у тимоцитов молодых животных, у которых в анализируемые промежутки времени площадь контакта с подложкой существенно не возросла и по прошествии 60–120 мин их диаметр становится меньше, чем у 3-месячных животных. У тимоцитов 2-летних животных отсутствует период активной перестройки цитоскелета, сопровождаемый ростом площади контакта клетки с подложкой. Кроме этого, начало потери клеткой контакта с подложкой в виде уменьшения ее диаметра наступает через 60 мин, т. е. значительно раньше.

Таблица 1 — Влияние времени адгезии тимоцитов 3-, 8- и 24-месячных животных на диаметр клеток в условиях ингибирования ДЦ Мх азидом натрия

Время адгезии, мин.	D, мкм.					
	3-месячные		8-месячные		24-месячные	
	контроль	азид натрия	контроль	азид натрия	контроль	азид натрия
30	6,6 ± 0,3	8,4 ± 0,3*	6,5 ± 0,2	6,4 ± 0,2	7,5 ± 0,2	7,0 ± 0,2*
60	7,0 ± 0,3	6,7 ± 0,3	6,2 ± 0,2	5,5 ± 0,2*	7,4 ± 0,2	6,3 ± 0,2*
120	7,4 ± 0,2	6,8 ± 0,3*	6,5 ± 0,2	5,6 ± 0,2*	7,2 ± 0,2	7,4 ± 0,2
180	7,1 ± 0,3	7,5 ± 0,3*	5,6 ± 0,1	5,7 ± 0,2	7,1 ± 0,2	6,8 ± 0,3

Примечание. Данные приведены в формате: среднего ± ошибки среднего; * — различия статистически значимы ($p < 0,001$) в сравнении с соответствующим параметром контроля в пределах одной возрастной группы (t-критерий Стьюдента); $n = 100$

Энергозависимый характер процесса адгезии клетки убедительно продемонстрирован в виде потери контакта клеток с подложкой, возникающей в условиях полного ингибирования Дц Мх тимоцитов, уже через 30 мин преинкубации тимоцитов животных всех возрастных групп с ингибитором — 6 мМ азидом натрия (таблица), что хорошо соотносится с данными литературы [8]. Об этом же свидетельствует то, что во всех возрастных группах животных диаметр тимоцитов, обработанных азидом, в подавляющем большинстве случаев меньше диаметра в контроле. Полученные результаты подтверждают наше предположение об ис-

ключительной зависимости функций цитоскелета от состояния митохондриального дыхания, поскольку азид, полностью блокирующий аэробную энергетику клетки, лимитирует многие ее энергозависимые процессы, включая двигательную активность, ключевым этапом которой является перестройка элементов цитоскелета.

В то же время обращает на себя внимание то, что у 3-месячных животных диаметр тимоцитов, предварительно обработанных азидом, на 30-й минуте адсорбции на стекле возрастает на 25 % по сравнению с контролем (таблица 1), что может быть связано со способностью тимоцитов в условиях деэнергетизации переключаться на весьма характерный для них путь анаэробного энергопроизводства, интенсивность которого выше у более молодых животных [9].

Заключение

С увеличением возраста крыс период достижения максимального диаметра выделенными из них тимоцитами укорачивается со 120 до 30 мин соответственно для тимоцитов 3-месячных животных и 8-, 24-месячных. Ингибирование азидом митохондриального дыхания тимоцитов приводит к уменьшению диаметра тимоцитов молодых и старых крыс, а у ювенильных наблюдаются немонотонные изменения этого показателя.

ЛИТЕРАТУРА

1. Анисимов, В. Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения / В. Н. Анисимов. — СПб.: Наука, 2003.
2. Friguet, B. Oxidized protein degradation and repair in ageing and oxidative stress / B. Friguet // FEBS Letters. — 2006. — Vol. 580. — P. 2910–2916.
3. Арутюнян, А. В. Механизмы свободнорадикального окисления и его роль в старении / А. В. Арутюнян // Успехи геронтологии. — 2009. — Т. 22, № 1. — P. 104–116.
4. Leach, J. K. Ionizing radiation-induced, mitochondria-dependent generation of reactive oxygen/nitrogen. / J. K. Leach // Cancer research. — 2001. — № 61 (10). — P. 3894–3901.
5. Добринских, Е. А. Микротрубочки необходимы для втягивания ламеллы в культивируемых клетках VERO / Е. А. Добринских, А. И. Воробьев // Цитология. — 2006. — Т. 48, № 11. — С. 906–917.
6. Mattila, P. K. Filopodia: molecular architecture and cellular functions / P. K. Mattila // Nature Rev. Molecular Cell Biol. — 2008. — Vol. 9, № 6. — С. 446–454.
7. Lymphocyte microvilli are dynamic, actin-dependent structures that do not require Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) for their morphology / S. Majstoravich [et al.] // Blood. — 2004. — Vol. 104, № 5. — P. 1396–1403.
8. Кисурина-Евгеньева, О. П. Распластывание эпителиальных клеток СПЭВ в норме и при действии ингибиторов энергообмена. Динамика распастывания / О. П. Кисурина-Евгеньева, Г. Е. Онищенко // Цитология. — 2002. — Т. 42, № 1. — С. 42–46.
9. Energy metabolism in thymic lymphocytes of normal and leukemic AKR mice / E. Ernest [et al.] // Cancer Research. — 1978. — № 38. — P. 1113–1119.

УДК 616.419-008.853.8

МУТАЦИОННЫЙ СТАТУС ПРИ Rh-НЕГАТИВНЫХ ХРОНИЧЕСКИХ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

**Новик Д. К.¹, Силин А. Е.¹, Мартинков В. Н.¹, Воропаева А. В.¹,
Силина А. А.¹, Тропашко И. Б.¹, Мартыненко С. М.¹, Смирнова Л. А.²**

¹Государственное учреждение

**«Республиканский научно-практический центр
радиационной медицины и экологии человека»**

г. Гомель, Республика Беларусь,

²Государственное учреждение образования

«Белорусская медицинская академия последипломного образования»

г. Минск, Республика Беларусь

Введение

Rh-негативные хронические миелопролиферативные заболевания — группа заболеваний клональной природы, в которую входит истинная полицитемия (ИП), эссенциальная тромбоцитемия (ЭТ), первичный миелофиброз (ПМФ) [1]. Открытые в последнее время молекулярно-генетические маркеры клональной миелопролиферации позволили по новому взглянуть как на этиологию, так и на патогенез клональной перестройки миелоидного ростка кроветворения в костном мозге при данной патологии. В 2016 г. мутации генов JAK2, CALR и MPL