

## Вплив лімфоцитарного кейлону на метаболічні процеси в лімфоцитах за умов імунної відповіді

К. Г. Гаркава, С. О. Олейнік, О. В. Задоріна, І. С. Михайлова

Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця  
Пр. Перемоги, 34, Київ, 03057, Україна

*Вивчали вплив лімфоцитарного кейлону на рівень синтетичних процесів та ліпопероксидацію в лімфоцитах за умов імунної відповіді. Встановлено, що кейлон достовірно знижує рівень синтетичних процесів та кількість продуктів перекисного окислення ліпідів: первинних кон'югатів і вторинних — малонового діальдегіду. В досліді in vitro зі стабільним радикалом дефінілпікрілгідрозилом (ДФПГ) виявлено, що лімфоцитарний кейлон, який отримували за годину до проведення реакції, зменшував концентрацію ДФПГ на 50 % за 7,6 хв, що свідчить про високі антиокислювальні властивості лімфоцитарного кейлону і можливість використання його як природного антиоксиданта.*

Вступ. Відомо, що зміна метаболізму в лімфоцитах призводить до зміни їхньої проліферації, диференціації, функціональної активності та імунологічної реактивності взагалі. Багато процесів в метаболізованих клітинах відбуваються за участю вільних радикалів. До них належать процеси перекисного окислення ліпідів (ПОЛ), продукти якого можуть зумовлювати деструктивні зміни клітинних мембран, метаболічний дисбаланс, ацидоз та загибель клітин [1]. Ліпіди є важливим субстратом для розвитку ланцюгових реакцій і незалежно від того, яким шляхом відбувається ПОЛ — ферментативним чи неферментативним, воно йде з утворенням вільних радикалів [2]. На швидкість цих процесів впливають речовини, які можуть активно взаємодіяти з перекисними радикалами і змінювати їхню концентрацію. До природних антиоксидантів належать пірокатехіни, стероїдні гормони, відновлені форми вітаміну К і убіхінони, токофероли, вітамін С, вітамін Р, ретинол, каротиноїди, але цими речовинами перелік природних антиоксидантів, мабуть, не закінчується.

Встановлено, що активні метаболіти кисню, продукти ПОЛ, можуть виконувати регуляторну роль стосовно клітинної проліферації [3, 4]. ПОЛ за умов розвитку імунної відповіді досягає макси-

мальних значень на 3-тю добу після антигенної стимуляції (пік проліферативної активності), в той же час кількість антитілоутворюючих клітин має максимальне значення на 5—7-му добу, а титри антитіл досягають максимуму на 9—11-ту добу досліду [4,5]. Пригнічення ПОЛ, можливо, пов'язано з якимись медіаторами, які проявляються або утворюються під час взаємодії антигена з антитілом [6]. На нашу думку, такими медіаторами можуть бути лімфоцитарні кейлони. В ряді робіт нами було показано, що лімфоцитарні кейлони — це біологічно активні речовини, які виробляються в лімфоїдній тканині для підтримки сталого рівня її клітинної маси і можуть нормалізувати жирнокислотний спектр мембранних ліпідів лімфоцитів під час імунної відповіді [7] та при антиоксидантній недостатності [8] і, вірогідно, вони є природними антиоксидантами.

У зв'язку з вищевикладеним метою даної роботи було вивчення впливу лімфоцитарного кейлону на синтетичні процеси в лімфоцитах та рівень ПОЛ у них за умов імунної відповіді.

Матеріали і методи. В роботі було використано 48 щурів, яких було розподілено на чотири групи. Перша і друга групи отримували антиген — еритроцити барана (ЕБ) внутрішньом'язово в дозі 0,5 мл 15 % ЕБ, при цьому друга група додатково одержувала кейлон внутрішньочеревинно в дозі 5 мкг/г, третя і четверта групи одержували ліпо-

полісахарид *Escherichia coli* в дозі 0,5 мг, а четверта — ще й кейлон у дозі 5 мкг/г. Лімфоцитарний кейлон отримували із лімфоцитів селезінки інтактних щурів (5 голів) за методом [9]. На 5-ту добу після імунізації тварин забивали, з їхньої селезінки одержували лімфоцити [10], у яких визначали інтенсивність вільнорадикальних процесів за рівнем малонового діальдегіду (МДА) у НАДФН- і аскорбат-залежних системах за умов реакції МДА з 2-тіобарбітуровою кислотою [11] та по кількості дієнових кон'югатів у гептан-ізопропанолових екстрактах [12]. На безпородних мишах (36 голів) на 5-ту добу імунної відповіді вивчали рівень синтетичних процесів у лімфоцитах. Синтетичну активність лімфоцитів виявляли методом флюоресцентного зондування [13] у відбитках селезінки по відношенню РНК/ДНК за коефіцієнтом Рігlera ( $\alpha$ -індекс) на мікросцитоспектрофлюориметрі на базі ЛЮМАМ-3, а структурно-функціональний стан ДНК хроматину визначали [14] на спектрофлюориметрі MPF-4 фірми «Hitachi» Японія при довжині хвилі 530 нм (збудження 460 нм).

Антиокислювальну активність лімфоцитарного кейлону визначали зі стабільним радикалом — дифенілпікрілгідрозилом (ДФПГ), який здатний реагувати з вільними радикалами і сполуками, що мають рухливі атоми водню. Реакцію ДФПГ з кейлоном проводили в спиртових розчинах. Речовини брали в еквімолярних кількостях. Розчини змішували і через рівні проміжки часу на спектрофотометрі «Specord-M-40» («Karl Zeiss», Німеччина) при 520 нм вимірювали екстинкцію. Далі будували графік залежності залишкової кількості ДФПГ від часу [15]. Для визначення часу, за який ДФПГ на 50 % перетворюється з радикала в нерадикальну форму, використовували рівняння:  $T_{50} = 1/C_0 \cdot K$ , де  $C_0$  — концентрація ДФПГ,  $K$  — константа швидкості реакції.

Статистичну обробку результатів здійснювали використанням  $t$ -критерія Ст'юдента за допомогою пакету стандартних програм на мікро-ЕОМ Мк-61.

Результати та обговорення. Результати з визначення синтетичної активності лімфоцитів за умов впливу лімфоцитарного кейлону представлено в табл. 1. Кейлон у дослідних групах на 5-ту добу імунної відповіді в більшій чи меншій мірі вірогідно знижував активність ДНП-комплексу лімфоцитів, коефіцієнт Рігlera (відношення РНК/ДНК), що в кінцевому підсумку призводило до пригнічення антитілоутворення [7].

Визначення рівня МДА показало, що незалежно від використаного антигена кількість МДА в аскорбат-залежній системі вірогідно зменшувалася в групах, де використовували лімфоцитарний кей-

Таблиця 1  
Вплив лімфоцитарного кейлону на синтетичну активність лімфоцитів

Умови досліду	Коефіцієнт Рігlera	Активність ДНП-комплексу
ЕБ (контроль), $n = 8$	$0,52 \pm 0,03$	$0,21 \pm 0,02$
ЕБ + кейлон (дослід), $n = 9$	$0,32 \pm 0,031^{***}$ $p < 0,001$	$0,09 \pm 0,01^{***}$ $p < 0,001$
ЛПС (контроль), $n = 6$	$0,71 \pm 0,059$	$0,38 \pm 0,04$
ЛПС + кейлон (дослід), $n = 7$	$0,44 \pm 0,06^{**}$ $p < 0,01$	$0,19 \pm 0,05^*$ $p < 0,05$
Інтактні	$0,20 \pm 0,03$	$0,12 \pm 0,02$

П р и м і т к а. Різниця з контролем вірогідна при \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . ЛПС — ліпополісахарид.

лон (табл. 2). Неініційоване ПОЛ також знижувалося в цих групах, а в четвертій групі, де використовували ліпополісахариди і кейлон, достовірно відрізнялося.

Оскільки ефективність імунологічної реакції організму зумовлена метаболічним станом лімфоцитів, структурою, складом мембран імунокомпетентних клітин і фізико-хімічними властивостями білок-ліпідних компонентів мембран та їхньою взаємодією, то природні речовини, які пригнічують ПОЛ, можуть за рахунок обмінних реакцій підтримувати структуру мембран, їхню функціональну активність і тим самим нормалізувати метаболічні процеси в лімфоцитах та регулювати імунологічну реакцію організму.

Раніше нами було показано, що кейлони впливають на ліпідну матрицю лімфоцитів і нормалізують жирнокислотний склад мембран лімфоцитів за умов імунної відповіді та при антиоксидантній недостатності [7, 8].

Кейлони, маючи поверхнево-мембранне походження [16], можливо, здатні вбудовуватися в ліпідну матрицю лімфоцитів і безпосередньо впливати на структуру мембран, змінюючи таким чином метаболічну та функціональну активність клітин. У нашому досліді кейлон був введений ззовні, він знижував рівень синтетичних процесів у лімфоцитах, рівень пероксидації за кількістю первинних і вторинних продуктів ПОЛ та відповідно дієнових кон'югатів і МДА, але в цьому випадку не виключається можливість впливу на імунну відповідь і

Таблиця 2

Кількість малонового діальдегіду в лімфоцитах (мкмоль МДА/мг білка за 30 хв) за умов імунної відповіді під час використання лімфоцитарного кейлону

Умови досліджу	НАДФН-залежна система	Аскорбат-залежна система	Контроль (неінфіковане ПОЛ)
ЕБ (контроль), n = 12	16,43±1,36	9,76±1,27	9,3±0,94
ЕБ + кейлон (дослід), n = 12	18,2±1,05 p > 0,05	6,79±0,51* p < 0,05	8,5±0,9 p > 0,05
ЛПС (контроль), n = 12	13,59±1,21	10,6±0,74	8,7±0,6
ЛПС + кейлон (дослід), n = 12	16,43±1,36 p < 0,05	8,19±0,7* p < 0,05	5,62±0,48*** p < 0,001

Примітка. Різниця з контролем вірогідна при \*p < 0,05; \*\*\*p < 0,001. При визначенні рівня дієнових кон'югатів було встановлено (табл. 3), що вірогідна різниця мала місце в ізопропаноловій фазі всіх груп, крім четвертої. Достовірна різниця була також і в дослідних групах порівняно з контрольними.

Таблиця 3

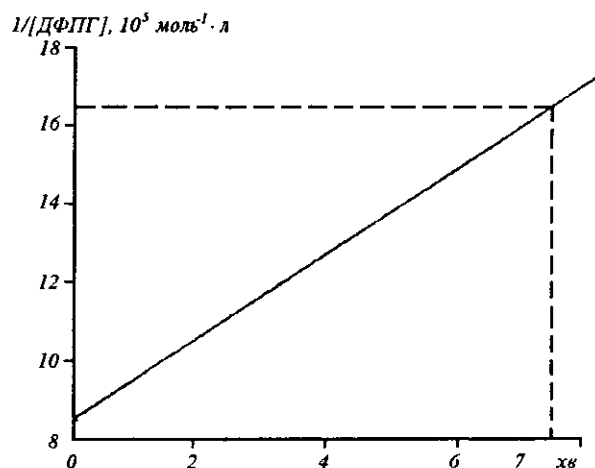
Рівень дієнових кон'югатів у лімфоцитах за умов імунної відповіді під час використання лімфоцитарного кейлону

Умови досліджу	Гептанова фаза (E232/E220)	Ізопропанолова фаза (E232/E220)
Інтактні, n = 10	0,526±0,044	0,424±0,031
ЕБ (контроль), n = 10	0,628±0,037	0,618±0,046* p <sub>1</sub> < 0,05
ЕБ + кейлон (дослід), n = 10	0,596±0,067	0,542±0,03*** p <sub>1</sub> < 0,05 p <sub>2</sub> < 0,01
ЛПС (контроль), n = 10	0,636±0,048	0,632±0,046** p <sub>1</sub> < 0,01
ЛПС + кейлон (дослід), n = 10	0,568±0,052	0,474±0,039*** p <sub>2</sub> < 0,01

Примітка. Різниця з групою інтактних тварин вірогідна при \*p<sub>1</sub> < 0,05; \*\*p<sub>1</sub> < 0,01; різниця з групою контрольних тварин вірогідна при \*\*\*p<sub>2</sub> < 0,01.

кейлону ендогенного та, можливо, їхньої синергичної дії.

Якщо рівень ПОЛ досягає максимальних значень у проліферативній фазі імунної відповіді і, на думку вчених, знижується у період антитілоутворення, що супроводжується падінням розмноження лімфоцитів [4,5], то продукція кейлону



Лінійний вираз (анаморфоза) кінетичної кривої реакції ДФПГ з лімфоцитарним кейлоном

лімфоцитами досягає максимальних значень в індуктивній фазі імунної відповіді, внаслідок чого пригнічується проліферативна активність імуннокомпетентних клітин [17]. Це вказує на суттєву роль кейлонів у реакціях ліпопероксидації клітинних мембран для регуляції метаболічної, проліферативної та функціональної активності клітин, що має, таким чином, загальнобіологічне значення.

У подальшому ми безпосередньо визначали наявність антиокислювальних властивостей лімфоцитарного кейлону в реакції з ДФПГ і будували графік залежності кінцевої кількості ДФПГ від часу (рисунок). Було встановлено, що лімфоци-

тарний кейлон, який отримували за годину перед дослідом з ДФПГ, зменшував концентрацію останнього на 50 % за 7,6 хв. Це вказує на високу антиокислювальну спроможність лімфоцитарного кейлону.

Таким чином, лімфоцитарний кейлон зменшує рівень синтетичних процесів, рівень ліпопероксидації в лімфоцитах за умов імунної відповіді і має високі антиокислювальні властивості, що дає змогу вважати його сильним природним антиоксидантом і в майбутньому використовувати при ряді патологічних станів організму, де реєструється дисбаланс імунної системи та активація вільнорадикальних реакцій.

Автори висловлюють щирю подяку Василю Миколайовичу Бобкову за проведення досліджень з дифенілпікрілгідрозілом.

*E. G. Garkava, S. A. Oleynik, O. V. Zadorina, I. S. Michailova*

Влияние лимфоцитарного кейлона на метаболические процессы в лимфоцитах в условиях иммунного ответа

Резюме

*Изучали влияние лимфоцитарного кейлона на уровень синтетических процессов и липопероксидацию в лимфоцитах в условиях иммунного ответа. Показано, что кейлон достоверно снижает уровень синтетических процессов и количество продуктов перекисного окисления липидов: первичных конъюгатов и вторичных — малонового диальдегида. В опытах in vitro со стабильным радикалом дефинилпикрилгидрозилом (ДФПГ) установлено, что лимфоцитарный кейлон, получаемый за час до проведения реакции, уменьшает концентрацию ДФПГ на 50 % за 7,6 мин, что указывает на высокие антиокислительные свойства лимфоцитарного кейлона и возможность использования его в качестве природного антиоксиданта.*

*K. G. Garkava, S. O. Oleynik, O. V. Zadorina, I. S. Michailova*

The influence of lymphocytic chalone on metabolic processes in lymphocytes under the conditions of immune response

Summary

*The influence of lymphocytic chalone on the level of synthetic processes and the lypoperoxydation in lymphocytes under conditions of immune response has been investigated. It has been established that chalone probably decreased the level of synthetic processes and the quantity of primary products POL - dien' conjugates and secondary ones — malonic dialdehyde. It has been established by in vitro experiments with dephinylpicrilhydrosil (DPPH) stable radical that the lymphocytic chalone, obtained 1 hour before the experiment decreased the DPPH concentration to 50 % in 7,6 min. This indicates high antioxydative properties of lymphocytic chalone and a possibility of its use as a natural antioxydant.*

#### ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бурлакова Е. Б., Храпова Н. Г. Перекисное окисление липидов мембран и природные антиоксиданты // Успехи химии.—1985.—54, № 9.—С. 1540—1550.
2. Бурлакова Е. Б., Голощанов А. Н., Керимов Р. Ф. Взаимосвязь между содержанием природных антиоксидантов и вязкостью липидов в мембранах органелл в норме // Бюл. эксперим. биологии и медицины.—1986.—101, № 4.—С. 431—433.
3. Зенков Н. К., Меньщикова Е. Б. Активированные кислородные метаболиты в биологических системах // Успехи соврем. биологии.—1993.—113, № 3.—С. 286—296.
4. Барабой В. А., Гриневич Ю. А., Малышев В. А., Лукашова Р. Г. Взаимосвязь кинетики перекисного окисления липидов сыворотки крови лабораторных животных и кинетики иммунного ответа на введение эритроцитов барана // Докл. АН УССР, сер. Б.—1989.—№ 7.—С. 57—59.
5. Лукашова Р. Г., Малышев В. А., Барабой В. А., Чеботарев В. Ф. Влияние гормонов тимуса на активацию перекисного окисления липидов в лимфоидных органах крыс в процессе развития гуморального иммунного ответа // Докл. АН УССР, сер. Б.—1989.—№ 9.—С. 63—67.
6. Сутковой Д. А. Перекисное окисление липидов как возможный фактор регуляции иммуногенеза // Молекулярно-клеточные механизмы иммунной регуляции гомеостаза и проблемы математического моделирования: Тез. докл. (Шушенское, 19—26 мая 1990 г.).—Красноярск, 1990.—С. 96—97.
7. Гаркава К. Г. Жирнокислотный склад липидного комплекса мембран лимфоцитов за умов імунної відповіді під час використання лімфоцитарного кейлону // Ліки.—1997.—№ 4.—С.—100—103.
8. Гаркава К. Г., Афоніна Г. Б., Задоріна О. В., Брюзгіна Т. С. Вплив лімфоцитарного кейлону на функційну активність лімфоцитів при антиоксидантній недостатності і корекції її вітаміном Є // Фізіол. журн.—1995.—№ 5—6.—С. 27—32.
9. Bullough W. S., Hewet C. L., Laurence E. H. The epidermal chalone: a preliminary attempt at isolation // Exp. Cell.Res.—1964.—36, № 1.—Р. 192—200.
10. Фримель Г. Н. Иммунологические методы.—М.: Медицина, 1984.—С. 294—302.
11. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.—М.: Наука, 1972.—252 с.
12. Волчегорский И. А., Налимов А. Г., Яровинский Б. Г., Лифшиц Р. И. Сопоставление различных методов к определению продуктов перекисного окисления липидов в гептан-изопропаноловых экстрактах крови // Вопр. мед. химии.—1989.—35, № 1.—С. 127—131.
13. Гаркавая Е. Г., Данова И. В. Флюоресцентное зондирование для оценки эффективности иммуномодуляторов // Новые физические методы в медицине: Тез. докл. I Респ. конф.—Ворошиловград, 1990.—С. 244—245.
14. Карнаухов В. Н., Карнаухова Н. А., Яшин В. А. и др. Методы и техника люминесцентной цитодиагностики.—Пушино: ОНТИНЦИАН СССР, 1983.—С. 33—43.
15. Починков Т. В., Тараховский М. Л., Портнягина М. Ф. и др. Экспресс-метод определения антиокислительной активности лекарственных веществ // Хим.-фарм. журн.—1989.—№ 5.—С. 565—569.
16. Неустроев Г. В. Роль кейлонов в регуляции пролиферативной активности клеток костного мозга, слюнных желез, тимуса: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук.—Москва, 1982.—46 с.
17. Гаркава К. Г. Склад ліпідної матриці мембран лимфоцитів після дії G1- і G2-лімфоцитарних кейлонів за умов використання екзогенного лімфоцитарного кейлону під час імунної відповіді // Біополімери і клітина.—1998.—14, № 5.—С. 410—413.

УДК 547.9:577.352.38:612.42:612.017  
Надійшла до редакції 14.12.99