ской безопасности и возможность их реализации в Российской Федерации // Токсикологический вестник. - 2001. - №6. - С. 2-5.
11. Малинин О.А. Ветеринарная токсикология: Учеб. пособие. – Корсунь-Шевченковский: ЧП Майданченко, 2002. – 464 с.
12. Островська Г.Ю., Бобирьов В.М. Активность системы антиоксидантной защиты в условиях хронического поступления диэтилдитиокарбамата при разных уровнях антиоксидантной обеспеченности организма // Современные проблемы токсикологии. – 1999. - №1. – С.50-52.
13. Пестициды: Справочник / Мартыненко В.И., Промоненко В.К., Кукаленко С.С. и др. – М.: Агропромиздат, 1992. – с. 368.
14. Проданчук М.Г., Великий В.І., Кучак Ю.А. Методологічні підходи до оперативної екогігієнічної оцінки асортименту та обсягів застосування пестицидів у сільському господарстві // Довкілля та здоров'я. - 2004. - №2. - С. 75-78.
15. Спиричев В.В., Матиус И.И., Кронштейн Л.М. Витамин Е // Экспериментальная витаминология. Минск: Наука и техника. – 1979. – С. 18-57.
16. Garabrant P. Review of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D). Epidemiology and Toxicology // Critical Reviews in Toxicology. – 2002. – №32(4). - P. 233-257.
17. Watt B.E., Bradberry S.M., Vale J.A. Cllorphenozy herbicides – mechanisms of toxicity // J. Toxicol. Clin. Toxicol. – 1999. – V. 37, N3. – P. 357-358.

Реферат

ПОКАЗАТЕЛИ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ У КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ПОСТУПЛЕНИИ ПЕСТИЦИДА АМИННОЙ СОЛИ 2,4-ДИХЛОРФЕНОКСИУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ

Бобырев В.Н., Цветкова Я.А.

Ключевые слова: пестициды, антиоксиданты, свободнорадикальное перекисное окисление липидов

В эксперименте на белых крысах вводили пестицид 2,4-ДА в дозе 1/10 от LD_{50}. Срок эксперимента 15 и 30 суток. Под влиянием хронического воздействия пестицида 2,4-ДА наблюдается активизация процессов СРПО липидов в крови и тканях печени, мозга и семенниках, снижение антиоксидантного обеспечения и фазное угнетение активности антиоксидантных ферментов. Полученные результаты являются основой для возможного исследования препаратов с антиоксидантной активностью при хронической интоксикации 2,4-ДА.

Summary

INDICES OF THE FREE RADICAL PEROXIDATION OF LIPIDS OF RATS UNDER CHRONICAL RECEIPT OF 2,4-DICHLOROPHENOXYACETIC ACID PESTICIDE

V.N. Bobyrev, Y.A. Cvetkova

Key words: pesticides, antioxidant, free radical peroxide oxygenation of lipids

In experiment the pesticide 2,4-DA in dose 1/10 from LD_{50} was administered white rats during 15-30 days. Under the chronic influence of 2,4-DA pesticide the activation of the processes of lipid FRPO in blood and hepatic tissues, brain and testis, the reduction of antioxidate defense and phase suppression of antioxidant enzyme activity may be observed. This investigation is basis for research of agents with antioxidant activity under chronic intoxication of 2,4-DA.

УДК: 616.099-092:612.112.94.015.2:612.6+612.017.1.06

ТИМАЛІН ВІДНОВЛЮЄ ЕКСПРЕСІЮ ПОВЕРХНЕВИХ АНТИГЕННИХ ДЕТЕРМІНАНТ ЛІМФОЦИТІВ, ПОПЕРЕДНЬО ОБРОБЛЕНИХ ТРИПСИНОМ

Весніна Л.Е., Кайдашев І.П.

Українська медична стоматологічна академія, м. Полтава

Досліджено пептидний комплекс тимусу тималін з метою визначити, яким чином тималін впливає на експресію поверхневих антигенних детермінант лімфоцитів, попередньо оброблених трипсином та порівняти його вплив з пептидним комплексом нирок. Попередня обробка лімфоцитів трипсином призвела до вірогідного зниження експресії поверхневих імуноглобулінових рецепторів, антигенних детермінант CD3, CD4 та CD8, за винятком CD72. Використання тималіну (0,5 мкг/мл) характеризувалось відновленням експресії поверхневих рецепторів лімфоцитів, попередньо видалених з поверхні мембрани за допомогою трипсину, та зміною перегрупувань рецепторів. Спрямованість дії тималіну цілком узгоджується, впливом пептидного комплексу нирок та підтверджує нашу думку стосовно механізмів цієї відновлювальної дії.

Ключові слова: лімфоцити, антигенні детермінанти, експресія, тималін, трипсин.

Структурна та функціональна сталість клітинних популяцій підтримується складною системою біорегуляції, серед якої важлива роль відводиться пептидним біорегуляторам, які мають аутокринну, паракринну та дістантну дію. На теперішній час вони виділені практично із усіх органів та тканин людини, перш за все – із центрального органу імуногенезу – тимусу (тимопоетин, тимозин, тималін). Вказані пептиди характеризуються широким спектром біологічної активності. Тималін, зокрема, безпосередньо впливає на реакції клітинного імунітету та системи, які знаходяться в залежності від змісту та функціональної активності Т-лімфоцитів, в умовах патології сприяє відновленню цілої низки фізіологічних функцій організму: імунологічної реактивності, гемопоезу, гемостазу, нейроендокринної регуляції [6,7].

Пептиди змусили дослідників змінити погляд на багато ключових принципів регуляції функцій на усіх рівнях інтеграції організму – від мембрани до функціональної системи в цілому. Біологічні ефекти регуляторних пептидів опосередковані їхньою взаємодією з мембранними рецепторними білками клітин, такими, як специфічні антигенні детермінанти, так звані кластери диференціювання - CD. Мембранні маркери CD окрім властивості виконувати функцію рецепторів, також є

сигнальними або адгезивними молекулами. Можливістю речовин різного походження підсилювати або пригнічувати експресію кластерів диференціювання імуноцитів та тим самим модулювати їхню функцію оцінюється імунотропна активність препаратів. Незважаючі на велику кількість досліджень, остаточний механізм взаємодії регуляторних пептидів з імунокомпетентними клітинами не з'ясовано. Залишається невідомим, на якому рівні відбувається ця взаємодія та які сигнальні шляхи можуть бути задіяні.

Вже перші дослідження тималіну in vitro показали, що він підсилює експресію рецепторів на Т-, та в меншій мірі – на В-лімфоцитах [16]. Також було встановлено in vitro, що тимоген, як і інші препарати – тимопоетин, тималін та α1-тимозин значно прискорюють появу рецепторів на клітинах тимусу, які попередньо були оброблені трипсином [6, 13].

Нами проведене дослідження пептидного комплексу, отриманого за оригінальним методом з кіркової речовини нирок [1]. За результатами дослідів з використанням ендогенних імуномодуляторів запропоновано мембраноопосередкований механізм дії пептидного комплексу нирок (ПКН) [3,4]. У подальшому при вивченні безпосереднього механізму дії було поставлено питання, яким чином пептидний комплекс буде діяти на лімфоцит, з мембрани якого попередньо видалені поверхневі рецептори, та чи присутні на мембрані власні рецептори до пептидних речовин. У експериментальних дослідженнях з використанням трипсину ПКН сприяв відновленню експресії рецепторів лімфоцитів, попередньо видалених з поверхні мембрани [2]. Було запропоновано два можливих механізму відновлення рецепторів, по-перше, це стимуляція на рівні клітинної мембрани, коли на поверхні клітини починають експресуватися рецептори, до того поглиблені у мембрану. По-друге – можливе прискорення під впливом ПКН збірки та транспортування на клітинну поверхню нових рецепторних молекул, що було підтверджено підсиленням під дією препарату експресії CD72, які не підлягали розщепленню трипсином.

У своїх дослідженнях ми використовуємо тималін, пептид, отриманий з центрального органу імуногенезу в якості пептиду порівняння. Мета запропонованого дослідження – визначити, яким чином тималін впливає на експресію поверхневих антигенних детермінант лімфоцитів, попередньо оброблених трипсином, та чи відрізняється цей процес від впливу ПКН.

Матеріали та методи

Експериментальну роботу проводили на лімфоцитах, отриманих з венозної крові здорових донорів за стандартним методом [8] на градієнті густини фіколтриомбраст. Після відмивання у фосфатно-сольовому буфері клітини культивували у середовищі 199 ("Sigma") 10% інактивованою телячою сироваткою при 37°С. В роботі використовували суспензію лімфоцитів в кількості 1-1,5×10^6/мл.

Попередню обробку клітин в контрольній та дослідній серіях проводили трипсином ("Sigma") - 1 мг/мл [9]. α-трипсин (ЕС 3.4.21.4) є сериновою протеїназою, яка розщеплює пептидні зв'язки, утворені лізином та аргініном. Після відмивання шляхом центрифугування у фосфатно-сольовому буфері лімфоцити інкубували в дослідних пробах з тималіном 1 годину при 37° С. Використовували комерційний препарат тималін (завод медпрепаратів, Санкт-Петербург, Росія) в дозі 0,5 мкг/мл.

Робота проводилась на основі використання способу моделювання поверхневих рецепторів лімфоцитів за допомогою пептидного комплексу, отриманого із кіркової речовини нирок, шляхом реєстрації зміни експресії мембранних рецепторів під впливом пептидів [11].

Рівень експресії поверхневих імуноглобулінових рецепторів визначали методом прямого імунофлюоресцентного аналізу з антитілами, які помічені флюоресцеїнізотіаціанатом (ФІТЦ), проти Ig A,M,G ("Sanofi", France). Експресію поверхневих рецепторів лімфоцитів реєстрували методом непрямої імунофлюоресценції з використанням моноклональних антитіл до антигенних детермінант CD3, CD4, CD8, CD72 та кон'югованих з ФІТЦ анти-F(ab)$_2$-антитіл (ТОО "Сорбент", Москва). Досліджені рецептори CD3, CD4, CD8 та мембранні імуноглобуліни за своєю структурою належать до суперродини імуноглобулінів, та зазнають впливу трипсину. Виключенням є молекула CD72 - лектин С-типу [14].

Лімфоцити за рівнем та характером флюоресценції розподіляли [11], використовуючі такі ознаки: дифузна флюоресценція мембрани, коли рецептори рівномірно розподілені на її поверхні; перегрупування у вигляді кластерів, коли рецептори збираються в окремі групи; петчів – рецептори групуються у вигляді плям, та кепів – так званий "капелюшок", групування на одному з полюсів лімфоцита [5]. Результати оброблені статистично (STATISTICA).

Результати та обговорення

Попередня обробка лімфоцитів трипсином сприяла вірогідному зниженню експресії поверхневих імуноглобулінових рецепторів, антигенних детермінант CD3, CD4 та CD8 (табл. 1). На поверхні CD72$^+$-клітин зміни рівня експресії рецепторів не спостерігалися [2, 15].

Таблиця 1.

Зміна експресії поверхневих рецепторів лімфоцитів під дією тималіну на клітинах, попередньо оброблених трипсином (M±σ)

Експресія антигенних детермінант (% позитивних клітин)	Інтактні лімфоцити, (n=6)	Лімфоцити, оброблені трипсином (n=6)	Лімфоцити, оброблені трипсином та інкубовані з тималіном в дозі 0,5 мкг/мл (n=6)
Ig A,M,G	22,67±3,78	8,50±4,59*	17,17±5,78**
CD 3	62,83±7,25	47,17±4,75*	59,33±8,87**
CD 4	25,33±4,55	8,83±2,93*	21,0±4,73**
CD 8	33,33±4,23	14,50±4,68*	25,50±5,0**
CD 72	16,50±4,68	18,0±5,02	22,83±6,40

*Примітка. Тут, та в табл. 2 * - p<0,05 – порівняння показників між інтактними лімфоцитами, та лімфоцитами, які попередньо були оброблені трипсином;*

*** - p<0,05 – порівняння показників між лімфоцитами, які попередньо були оброблені трипсином та лімфоцитами, які були оброблені трипсином та інкубувались з тималіном.*

Окрім зменшення рівня флюоресценції було відмічено перегрупування рецепторів у площині мембрани: зменшення кількості петчів та практично повне зникнення кластерів поверхневих імуноглобулінів, подібні зміни відбувались з кепами та кластерами CD4 і CD8 (табл. 2). Відзначено зменшення інтенсивності флюоресценції клітин, що може відображати зменшення густини рецепторів на мембрані в результаті дії трипсину.

Інкубація лімфоцитів, попередньо оброблених трипсином з тималіном, показала збільшення експресії поверхневих імуноглобулінів у 2,0 рази ($p<0,05$). Характер перегрупувань змінився таким чином – вірогідно збільшилась кількість петчів з поверхневих імуноглобулінів у 1,9 рази.

Таблиця 2.

Зміна характеру перегрупувань поверхневих рецепторів лімфоцитів під дією тималіну на клітинах, попередньо оброблених трипсином (M±σ)

Експресія антигенних детермінант (% позитивних клітин)	Інтактні лімфоцити, (n=6)	Лімфоцити, оброблені трипсином (n=6)	Лімфоцити, оброблені трипсином та інкубовані з тималіном в дозі 0,5 мкг/мл (n=6)
Ig A,M,G			
0	77,33±3,78	91,50±4,59*	82,83±5,78**
кепи	5,33±3,56	4,33±2,42	6,17±2,40
петчі	11,0 ±1,55	4,17±2,99*	8,0 ±3,85**
кластери	6,33±2,42	-	3,0 ±2,53
CD 3			
0	37,17±7,25	52,83±4,75*	40,67±8,87**
кепи	11,50±3,21	9,67±3,33	11,17±4,54
петчі	23,17±3,66	11,0 ±2,61*	15,0 ±3,95**
кластери	28,17±4,96	26,50±3,27	33,17±5,85
CD 4			
0	74,67±4,55	91,17±2,93*	79,0 ±4,73**
кепи	8,0 ±2,0	4,0 ±1,41*	9,50±4,18**
петчі	4,17±1,47	4,0 ±2,83	6,50±4,42
кластери	13,17±3,25	0,83±0,98*	5,0±3,41**
CD 8			
0	66,67±4,23	85,50±4,68*	74,50±5,01**
кепи	10,17±2,64	7,50±3,78	10,17±4,63
петчі	5,0 ±2,68	5,0 ±2,76	4,17±2,99
кластери	18,17±5,88	2,0 ±1,41*	11,17±6,55**
CD 72			
0	83,50±4,68	82,0 ±5,02	77,17±6,40
кепи	7,17±2,79	11,50±3,51*	12,17±5,60
петчі	5,0 ±3,03	5,50±2,35	8,33±4,18
кластери	4,33±2,17	1,0 ±0,89*	2,33±1,86

Примітка: 0 – клітини, у яких відсутня флюоресценція.

Рівень експресії антигенних детермінант CD3 – підвищувався на 25,78% , що супроводжувалось вірогідним збільшенням кількості петчів на 36,36%.

Отримані дані рівня експресії CD4 показали вірогідне збільшення в 2,4 рази, що супроводжувалось підвищенням кількості кепів у 2,4 рази та кластерів – в 6,0 разів ($p<0,05$).

Під впливом тималіну рівень експресії CD8 збільшився в 1,8 рази, збільшилась кількість кластерів, утворених молекулами CD8 у 5,6 рази ($p<0,05$).

Визначення антигенної детермінанти CD72 показало невірогідні зміни експресії.

Таким чином, пептидний комплекс тимусу – тималін відновлював експресію поверхневих рецепторів лімфоцитів, попередньо видалених з мембрани за допомогою трипсину, та модулював перегрупування рецепторів.

Додавання в середовище інкубації пептидного комплексу нирок викликало відновлення висхідного рівня експресії поверхневих імуноглобулінових рецепторів, CD3, CD4, тенденцію до збільшення експресії CD8 [2, 15]. Експресія CD72 під дією ПКН вірогідно збільшувалась, також спостерігалось підвищення рухливості рецепторів у площині мембрани з формуванням різних типів груп.

Порівняння показників двох серій досліджень свідчить про односпрямованість дії як ПКН, так і тималіну, незважаючи на різне походження цих пептидів. Результати дають можливість підтримати нашу думку щодо механізмів дії ПКН на мембрану лімфоцитів. Згідно з концепцією мембраноопосередкованої дії цілком вірогідна реалізація двох можливих шляхів відновлення рецепторів, по-перше, під впливом пептидів (рівень клітинної мембрани) на поверхню клітини виходять рецептори; до того заглиблені у її товщу. По-друге – не виключено, що пептидні речовини (тималін та ПКН) можуть впливати на внутрішньоклітинний рівень утворення рецепторів, зокрема, прискорюючі збірку та транспортування на клітинну поверхню нових рецепторних молекул. На користь цього, ми вважаємо, свідчить підсилення під дією ПКН експресії молекул CD72, які не розщеплюються трипсином.

Також мембраноопосередкований механізм дії не виключає і прямий вплив пептидного комплексу на саму мембрану, наприклад, коли занурені в ліпідний матрикс молекули регуляторних пептидів отримують можливість взаємодії з експонованими в товщині мембрани сайтами різних білків, зокрема, мембранозв'язаних ферментів та рецепторів інших біологічно активних речовин [12]. Така нерецепторна дія для регуляторних пептидів зараз знаходить своє підтвердження в експериментальних дослідженнях [10].

Таким чином, результати цього дослідження свідчать, що тималін відновлює експресію поверхневих рецепторів лімфоцитів, попередньо оброблених трипсином. Спрямованість дії тималіну цілком узгоджується з ефектом, який має пептидний комплекс нирок та підтверджує нашу думку стосовно механізмів цієї відновлювальної дії.

Література

1. А.С. 10180А. Україна. МКІ 5 А61 К37/00. Спосіб одержання біологічно активної речовини, що має регенераторну та модулюючу дію /Кайдашев І.П., Катрушов О.В. //Промислова власність.- 1996.- № 3.- С. 3.1.76-3.1.77.
2. Веснина Л.Э. Эффект ремодуляции поверхностных рецепторов лимфоцитов пептидным комплексом почек //Архив клин. и эксперим. мед.- 2000.- Т. 9, № 3.- С. 353-355.
3. Веснина Л.Э., Кайдашев И.П. Экспрессия мембранных рецепторов лимфоцитов под влиянием пептидного комплекса почек на фоне действия иммуномодуляторов //Иммунология.- 1999.- № 6.- С. 36-39.
4. Веснина Л.Э., Кайдашев И.П. Особенности воздействия пептидного комплекса почек на експрессию антигенных детерминант лимфоцитов, обработанных интерлейкином-2 и гидрокортизоном //Иммунология.- 2000.- № 2. - С. 17-21.
5. Иммунология: В 3-х т. Т.1 /Под ред. У. Пола.- М.: Мир, 1987-1988.- 476 с.
6. Иммунология гормонов тимуса /Под ред. Ю.А. Гриневича, В.Ф. Чеботарева. - К.: Здоров'я, 1989.- 152 с.
7. Кузник Б.И., Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. Цитомедины. 25-летний опыт экспериментальных и клинических исследований. – СПб:Наука, 1998.- 310 с.
8. Лимфоциты. Методы. /Под ред. Дж. Клауса.- М.: Мир, 1990.- 392 с.
9. Луцик М.Д., Е.Н. Панасюк, Луцик А.Д. Лектины. Львов: Вища школа, 1981.- 155 с.
10. Островская Г.В. Первинні механізми мембраномодулюючої дії біорегуляторів природного і синтетичного походження: Автореф. дис. ... д.б.н. – Київ, 2005.- 44 с.
11. Пат. 53122А України 7 А 61К35/23. Спосіб моделювання поверхневих рецепторів лімфоцитів. – Веснiна Л.Є., Кайдашев І.П. – N 2002032132; Заявл. 18.03.2002; Опубл. 15.01.2003; Бюл. № 1.
12. Рыбальченко В.К. Нейрогипофизарный гормон окситоцин – ингибитор Ca^{2+}–Mg^{2+}–АТФ-азы плазматической мембраны гладкомышечных клеток //Пробл. физиол. гипоталамуса.- 1987.- Вып. 21.- С. 76-79.
13. Серый С.В., Пасхина Т.Г., Пелевин М.А. и др. Влияние иммуноактивных пептидов тимуса на регенерацию рецепторов тимоцитов //Физиологическое и клиническое значение регуляторных пептидов: Тез. докл., Горький /АН СССР. Пущино, 1990. – С. 163.
14. Сидоренко С.П. Поверхностные антигены клеток человека, систематизированные международными рабочими совещаниями по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека //Імунологія та алергологія.- 1998.- № 3.- С. 16-38.
15. Тканевые регуляторные пептиды (теоретические основы и перспективы клинического применения) /Веснина Л.Э., Гаркович А.Л., Грицай Н.Н. и др.; Под общ. ред. Кайдашева И.П., Мищенко В.П., Рыбальченко В.К. – К.: Здоров'я, 2003.- 392 с.
16. Хавинсон В.Х., Морозов В.Г. Иммуномодулирующее действие фактора тимуса в патологии //Иммунология.- 1981.- № 5.- С. 28-31.

Реферат

ТИМАЛИН ВОССТАНАВЛИВАЕТ ЭКСПРЕССИЮ ПОВЕРХНОСТНЫХ АНТИГЕННЫХ ДЕТЕРМИНАНТ ЛИМФОЦИТОВ, ПРЕДВАРИТЕЛЬНО ОБРАБОТАННЫХ ТРИПСИНОМ

Веснина Л.Э., Кайдашев И.П.

Ключевые слова: лимфоциты, антигенные детерминанты, экспрессия, тималин, трипсин.

Исследован пептидный комплекс тимуса тималин с целью определить, каким образом тималин влияет на экспрессию поверхностных антигенных детерминант лимфоцитов, предварительно обработанных трипсином, и сравнить его действие с пептидным комплексом почек. Предварительная обработка лимфоцитов трипсином привела к достоверному снижению экспрессии поверхностных иммуноглобулиновых рецепторов, антигенных детерминант CD3, CD4 и CD8, за исключением CD72. Использование тималина (0,5 мкг/мл) характеризовалось восстановлением экспрессии поверхностных рецепторов лимфоцитов, предварительно удаленных с поверхности мембраны с помощью трипсина, и изменением перегруппировки рецепторов. Направленность действия тималина полностью согласовывается с эффектом, который оказывает пептидный комплекс, полученный из коркового вещества почек, и подтверждает нашу мысль относительно механизмов этого восстановительного действия.

Summary

THYMALINUM RENEWS EXPRESSION OF SUPERFICIAL ANTIGENIC DETERMINANTS OF LYMPHOCYTES PREVIOUSLY PROCESSED WITH TRYPSIN

Vesnina L.E., Kaidashev I.P.

Key words: lymphocytes, superficial antigenic determinants, expression, Thymalin, Trypsin.

Thymin being thymus peptide complex has been studied to found out how Thymalin influences on the expression of superficial antigenic determinants of lymphocytes previously processed by Trypsin and to compare its action with kidney peptide complex. Preliminary treating of lymphocytes by Trypsin has resulted in reliably decrease of the expression of superficial immunoglobulin receptors, antigenic determinants CD3, CD4 and CD8, except for CD72. Use of Thymalin (0,5 mkg/mls) was characterised by renewal of expression of lymphocyte superficial receptors removed from a membrane surface beforehand treated with Trypsin, and change of receptors' regrouping. The Thymalin directed action is completely coordinated with effect, which renders peptide complex obtained from kidney cortex substance and confirms our idea concerning mechanisms of this renewing action.