

БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

УДК 612.017.12
ГРНТИ 34.43.29

РИТМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ТКАНИ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ В ОНТОГЕНЕЗЕ ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ СТРЕССЕ

DOI: [10.31618/ESU.2413-9335.2020.3.72.633](https://doi.org/10.31618/ESU.2413-9335.2020.3.72.633)

Рожкова Ирина Семеновна

*доцент, кандидат медицинских наук, доцент кафедры биологии и ботаники
ФГБОУ ВО Астраханский государственный медицинский университет
Минздрава России, 414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, 121*

АННОТАЦИЯ

В условиях экспериментальной интоксикации рассмотрены возрастные особенности околочасовых ритмов общего белка, альбумина в ткани лимфатических узлов. Использование хронобиологического подхода и биохимического метода исследования позволило провести сравнение ритмической активности общего белка и альбумина в ткани лимфатических узлов в онтогенезе, при хроническом воздействии серосодержащего природного газа и на фоне введения комплекса антиоксидантов. Выявленные колебания содержания общего белка и альбумина могут быть охарактеризованы как околочасовые с периодами от 20 - 40 до 60 минут. В эксперименте установлен более высокий уровень содержания продуктов перекисного окисления липидов у молодых и старых крыс, в сравнении с группой половозрелых животных. Эксперименты показали, что введение комплекса антиоксидантов восстанавливает ослабленную функцию лимфоузлов, приводя к снижению уровня свободно-радикальных процессов во всех возрастных группах, но с более выраженным эффектом у молодых животных. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о снижении устойчивости ткани лимфатических узлов с возрастом и об истощении антиоксидантной системы.

ABSTRACT

Under experimental intoxication, age-related features of the ultradian rhythms of the total protein, albumin in the tissue of the lymph nodes are considered. Using the chronobiological approach and the biochemical research method, a comparison was made of the rhythmic activity of total protein and albumin in the tissue of the lymph nodes in ontogenesis, with chronic exposure to sulfur-containing natural gas and against the background of the introduction of a complex of antioxidants. The revealed fluctuations in the content of total protein and albumin can be characterized as ultradian with periods from 20 - 40 to 60 minutes. The experiment established a higher level of lipid peroxidation products in young and old rats, in comparison with a group of mature animals. The experiments showed that the introduction of a complex of antioxidants restores the weakened function of the lymph nodes, leading to a decrease in the level of free radical processes in all age groups, but with a more pronounced effect in young animals. The obtained experimental data indicate a decrease in the stability of the tissue of the lymph nodes with age and the depletion of the antioxidant system.

Ключевые слова: околочасовые ритмы, лимфатические узлы, крысы, хроническая интоксикация, стресс, свободно-радикальные процессы, онтогенез, перекисное окисление липидов, окислительная модификация белков.

Key words: the ultradian of rhythms, lymph nodes, rats, chronic intoxication, stress, free radical processes, ontogenesis, lipid peroxidation, oxidative protein modification.

В настоящее время изучение пространственно-временной организации живых систем приобретает все большее значение [2]. Околочасовые и суточные ритмы отличаются от других известных биологических ритмов эндогенностью, и не соответствуют ни одному из обнаруженных циклов внешней среды [4]. Такие ритмы ведут себя как регуляторные осцилляторы, и их следует рассматривать как важнейший компонент временной организации тканей [2]. Доказано, что ультрадианные ритмы могут служить не только надежным маркером морфологической зрелости, но и функциональной активности ткани [4]. Регистрируя особенности таких колебаний можно выявить эффекты токсического воздействия на органы, так как они связаны со спецификой

клеточного метаболизма, отражая его не стабильность.

Сероводород, являющийся основным компонентом природного газа Астраханского газоконденсатного месторождения (АГКМ), обладает высокой токсичностью для всего живого [1]. Обладая способностью проникать через гистогематические барьеры, и действуя в объеме циркулирующей крови, он нарушает обменные процессы между эндотелием кровеносных сосудов и клетками [6, 7]. Кроме того, сероводород обладает способностью ингибировать электронный транспорт в митохондриях, путем формирования прочной связи с железом в молекулах цитохромоксидаз, что провоцирует формирование тканевой гипоксии [5, 8, 9]. Угнетаются ферменты, нарушается кислотно-щелочное равновесие.

Избыточное накопление свободных радикалов в тканях приводит к снижению уровня утилизации кислорода, к дефициту энергии и развитию оксидативного стресса [3]. Выраженность защитных реакций организма на хроническое воздействие экзотоксиканта во многом зависит от морфофункционального состояния тканей [5, 6]. Анализ литературных источников показывает, что сведений о реакции ультрадианных ритмов общего белка и альбумина в ткани лимфоузлов крыс в онтогенезе, при хронической интоксикации природным сероводородсодержащим газом и введении комплекса антиоксидантов практически нет.

В связи с этим, целью работы стало изучение ритмической активности общего белка, альбумина, и особенностей свободно-радикальных процессов в лимфатических узлах крыс – самцов в норме, при воздействии природным газом Астраханского газоконденсатного месторождения (АГКМ) и введении комплекса антиоксидантов.

Материалы и методы. Объектом исследования служили 90 самцов беспородных белых крыс, которых содержали в условиях вивария при свободном доступе к пище и воде. Животные были разделены на две группы: контрольную и экспериментальные. Интактные и опытные животные согласно возрасту были подразделены на три подгруппы: первая подгруппа – молодые (неполовозрелые) особи, вторая подгруппа – половозрелые, третья подгруппа – старые крысы. Исследования на животных проводились в осенне-зимний период с целью исключения влияния сезонных ритмов. Группа экспериментальных животных подвергалась воздействию природного сероводородсодержащего газа АГКМ, в концентрации 90 ± 4 мг/м³ в течение 6 недель по 4 часа в день (понедельник – пятница). Контрольные животные помещались в ту же камеру, на тот же срок с обычным составом дыхательной смеси без примеси газа.

Все возрастные группы экспериментальных животных в течение 6 недель опыта через день получали внутримышечно 0,01 мг тималина из расчета на 100 г массы тела. Введение витамина Е (10% масляного раствора альфа-токоферола ацетата) осуществлялось *per os* при помощи инсулинового шприца без иглы в дозе 0,5 мг на 100 г массы тела каждого животного в течение 14 дней до опыта и во время всего периода затравки.

Наркотизация животных осуществлялась этаминалом натрия (внутрибрюшинно в дозе 5 мг на 100г массы тела), после чего осуществляли декапитацию и производили забор ткани лимфатических узлов через каждые 20 минут в течении 3-х часов от момента прекращения эксперимента. Гомогенизацию лимфатических узлов на фосфатном буфере рН 7,45 готовили непосредственно перед измерением.

Определение белка в гомогенатах ткани регистрировали с помощью биуретового метода на спектрофотометре Baekman (США) при длине волны 500—560 нм. Определение содержания

альбумина в гомогенатах ткани лимфоузлов осуществлялось унифицированным методом, основанном на взаимодействии альбумина с бромкрезоловым зеленым. Измерения проводили на спектрофотометре Baekman (США) при длине волны 630—690 нм. Регистрировались также показатели свободнорадикальных процессов: исходное перекисное окисление липидов (ПОЛ) по уровню содержания малонового диальдегида (МДА) в нмоль/0,05 г сырого веса ткани, а скорость спонтанного (Сп. ПОЛ) и аскорбатзависимого (Аск. ПОЛ) в нмоль образовавшегося МДА в пробе за 1 час инкубации. Окислительную модификацию белков в плазме крови определяли на основании реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков белков с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДФГ) с образованием окрашенных производных динитрофенилгидразона при длине волны 270 нм на спектрофотометре Baekman (США). Материалы исследования были обработаны статистически с использованием компьютерной программ Microsoft Excel и «Косинор-анализ».

Результаты и обсуждения. Зарегистрированные ритмические колебания уровня общего белка и альбумина являются окологласовыми и период их составляет от 20 - 40 до 60 минут. Амплитуды колебаний общего белка и альбумина у молодых интактных животных составили около 56% и 79% от среднего соответственно.

В условиях интоксикации наблюдается выраженное угнетение синтетической активности, в результате регистрируется снижение содержания общего белка на 26,7% и альбумина на 78,6% от среднего. При токсическом воздействии происходит возрастание амплитуды колебаний альбумина на 14%, но регистрируется снижение амплитуды колебаний общего белка. Это свидетельствует о низкой степени синхронизации клеток в тканях лимфатических узлов молодых крыс, что обеспечивало бы их необходимое функционирование при действии экзотоксиканта.

Амплитуда колебаний содержания общего белка и альбумина в тканях лимфатических узлов половозрелых интактных животных несколько ниже, чем у неполовозрелых крыс, и составила 56% и 65% от среднего с периодами в 20 и 40 минут соответственно. Необходимо отметить, что динамика содержания общего белка и альбумина сохраняет окологласовую периодичность в тканях лимфоузлов стрессированных половозрелых крыс. Тем не менее, токсическое воздействие приводит к снижению амплитуды колебаний, как общего белка, так и альбумина на 3% и 15% соответственно, что тем самым модифицирует ритмическую кривую. На фоне хронической интоксикации наблюдается выраженное угнетение ритмической активности изучаемых белков. Так, снижение уровня содержания общего белка происходит на 21% и альбумина на 53% от среднего в сравнении с контрольными значениями. Зарегистрированные изменения окологласовой

ритмики белкового обмена может быть следствием как торможения синтеза белков в органе, так и поступления белков в ткань из плазмы.

Сравнивая в онтогенетическом аспекте ритмическую активность изучаемых белков в тканях лимфоузлов интактных старых крыс, нами отмечено снижение, как содержания, так и амплитуды колебаний общего белка и альбумина с периодичностью в 40 и 60 минут. Из литературных источников [2, 8, 12] известно, что на фоне хронической сероводородной интоксикации наблюдается подавление ферментных систем, транспорта клеточных белков, что сопровождается угнетением и синтетической активности, как на клеточном, так и на тканевом уровнях организации. В результате, в тканях лимфоузлов стрессированных старых крыс нами зарегистрировано снижение содержания общего белка на 55% и альбумина на 76,5% от среднего в сравнении с контролем. В условиях стресса динамика содержания общего белка и альбумина в тканях лимфоузлов старых крыс хотя и сохраняет окологласовую периодичность, но токсическое

воздействие приводит к снижению амплитуды колебаний, как общего белка, так и альбумина на 5,5% и 19,5% соответственно, что также модифицирует ритмическую кривую.

Сравнивая возрастные особенности свободнорадикального гомеостаза лимфатических узлов крыс у интактных животных, обращает на себя внимание тот факт, что содержание продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой выше у молодых животных (см. табл. 1), достигая уровня $7,89 \pm 0,382$ нмоль/0,05 г ткани ($P < 0,05$). Значительно ниже этот показатель у половозрелых крыс ($2,49 \pm 0,293$ нмоль/0,05 г ткани, $P < 0,05$) и старых животных ($1,22 \pm 0,325$ нмоль/0,05 г ткани, $P < 0,05$). Отмечается усиление скорости аскорбатзависимого ПОЛ ($P < 0,05$) у молодых крыс по сравнению с половозрелыми: с $5,89 \pm 0,697$ до $16,44 \pm 0,945$ нмоль/ч, а также повышение уровня спонтанного ПОЛ: с $11,54 \pm 0,662$ до $11,95 \pm 0,783$ нмоль/ч. Заметно ниже уровень липидной пероксидации ткани лимфатических узлов старых интактных животных в сравнении с группой молодых (неполовозрелых) крыс (см. табл. 1).

Таблица 1

Уровень свободно-радикальных процессов в лимфатических узлах крыс разного возраста ($M \pm m$)

Группа	Молодые животные			Половозрелые животные			Старые животные		
	Исх. ПОЛ	Сп. ПОЛ	Аск. ПОЛ	Исх. ПОЛ	Сп. ПОЛ	Аск. ПОЛ	Исх. ПОЛ	Сп. ПОЛ	Аск. ПОЛ
К	$7,89 \pm 0,382$	$11,95 \pm 0,783$	$16,44 \pm 0,945$	$2,49 \pm 0,293$	$11,54 \pm 0,662$	$5,89 \pm 0,697$	$1,22 \pm 0,325$	$5,709 \pm 0,723$	$15,68 \pm 0,303$
ССГ	$11,48 \pm 0,820^*$	$69,71 \pm 0,730^*$	$64,11 \pm 0,76^*$	$11,73 \pm 0,493^*$	$76,18 \pm 0,840^*$	$79,20 \pm 0,759^*$	$12,43 \pm 0,433^*$	$74,91 \pm 0,814^*$	$77,7 \pm 0,741^*$
ССГ+АО	$1,22 \pm 0,458^{**}$	$13,33 \pm 0,073^{**}$	$6,40 \pm 0,210^{**}$	$0,72 \pm 0,445^{**}$	$13,53 \pm 0,501^{**}$	$12,08 \pm 0,548^{**}$	$2,73 \pm 0,439^{**}$	$23,75 \pm 0,436^{**}$	$58,95 \pm 0,259^{**}$

Примечание: К - контрольная группа, ССГ – воздействие серосодержащего газа, ССГ + АО - воздействие серосодержащего газа на фоне введения антиоксидантов; * $p < 0,05$ -0,001 в сравнении с контрольным значением, ** $p < 0,05$ -0,001 в сравнении с контрольным значением

У старых животных (см. табл. 1) скорость спонтанного ПОЛ ниже на 52%, а содержание исходного ПОЛ меньше на 84,5% ($P < 0,05$). Показатели окислительной модификации белков выше в лимфатических узлах старых крыс ($0,15 \pm 0,045$ мкмоль/мг белка), и существенно ниже на 47% ($P < 0,05$) в лимфатических узлах молодых интактных животных. При хроническом воздействии серосодержащего природного газа АГКМ интенсивность свободно-радикальных процессов и уровень антиоксидантной защиты в ткани лимфатических узлов свидетельствует о возрастных особенностях функционирования лимфоузлов в ответ на действие токсиканта. При сравнении показателей пероксидации липидов установлено, что содержание продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, с возрастом увеличивается и способствует развитию окислительного стресса у животных, о чем свидетельствует повышение уровня исходного ПОЛ, рост скоростей аскорбатзависимого ПОЛ и спонтанного ПОЛ у старых крыс (см. табл. 1) в сравнении с молодыми животными ($P < 0,05$). Зарегистрированное повышение исходного ПОЛ на 8%, усиление скорости спонтанного и

индуцированного ПОЛ на 7,5% и на 21% соответственно, усугубляет токсический эффект сероводорода на ткань лимфатических узлов старых крыс. Значительно более низкий уровень исходного ПОЛ ($P < 0,05$) в условиях гипоксии зафиксирован у молодых животных ($11,48 \pm 0,820$ нмоль/0,05 г ткани), однако отмечен рост скорости спонтанного ПОЛ (до $76,18 \pm 0,840$ нмоль/ч, $P < 0,05$) и индуцированного ПОЛ (до $79,2 \pm 0,759$ нмоль/ч, $P < 0,05$) у половозрелых крыс, в сравнении с молодыми животными. Уровень окислительной модификации белков выше в ткани лимфатических узлов молодых и половозрелых животных, в отличие от старых крыс (см. табл. 1), у которых этот показатель значимо ниже ($0,04 \pm 0,027$ мкмоль/мг белка, $P < 0,05$). Полученные данные свидетельствуют о токсическом действии сероводородсодержащего природного газа на ткань лимфатических узлов и развитии оксидативного стресса во всех возрастных группах животных.

Предварительное введение витамина Е до начала опыта и введение тималина стрессированным животным привело к снижению уровня свободно-радикальных процессов во всех возрастных группах, но с более выраженным

эффектом у молодых и старых животных. Результаты исследования показали о своевременности и целесообразности антиоксидантной коррекции на фоне хронической интоксикации.

Список литературы

1. Боев В. М., Сетко Н. П. Сернистые соединения природного газа и их действие на организм / М. : Медицина. 2001. 216с. [Boev V. M., Setko N. P. Sernistye soedinenija prirodnogo gaza i ih dejstvie na organizm. Medicina. 2001. (In Russ).]
2. Бродский В. Я. Околочасовые метаболические ритмы // Биохимия. 2014. т.79. Вып. 6. С. 621–634. [Brodskij V. Ja. Okolochasovye metabolicheskie ritmy. Biohimija. 2014;79(6):62-634. (In Russ).]
3. Дубинина Е.Е. Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме тканей при состояниях стресса // Вопр. Мед. химии. 2001. Т. 47. Вып. 6. С. 561 – 581. [Dubinina E.E. Rol' aktivnyh form kisloroda v kachestve signal'nyh molekul v metabolizme tkanej pri sostojanijah stressa. Vopr. Med. Himii. 2001;47(6):561-581. (In Russ).]
4. Загускин С. Л. Биологическое время: саморегуляция и управление // Пространство и время. 2016. Т. 22. № 4. С. 254–266. [Zaguskin S. L. Biologicheskoe vremja: samoreguljacija i upravlenie. Prostranstvo i vremja. 2016; 22(4):254-266. (In Russ).]
5. Мажитова М. В., Теплый Д. Л., Тризно Н. Н. и др. Хроническое влияние природного газа Астраханского месторождения на антиоксидантную активность и Redox-потенциал плазмы крови и ткани мозга в эксперименте // Естественные и технические науки. 2011. Т. 56. № 6. С. 149-153. [Mazhitova M. V., Teplyj D. L., Trizno N. N. i dr. Hronicheskoe vlijanie prirodnogo gaza Astrahanskogo mestorozhdenija na antioksidantnuju aktivnost' i Redox-potencial plazmy krovi i tkani mozga v jeksperimente. Estestvennye i tehnicheckie nauki. 2011;56(6):149-153. (In Russ).]
6. Рожкова И. С., Теплый Д. Л., Фельдман Б. В. Онтогенетические особенности показателей свободнорадикальных процессов плазмы крови крыс // Астраханский медицинский журнал. 2013. Т. 8. № 1. С. 209-211. [Rozhkova I. S., Teplyj D. L., Fel'dman B. V. Ontogeneticheskie osobennosti pokazatelej svobodnoradikal'nyh processov plazmy krovi krys. Astrahanskij medicinskij zhurnal. 2013;8(1):209-211. (In Russ).]
7. Ярошинская А.П., Лазько А.Е., Зиндан С. Влияние серосодержащего газа на дренажную функцию системы микроциркуляции // Морфология. 2016. Т. 149. Вып. 3. С. 249. [Jaroshinskaja A.P., Laz'ko A.E., Zindan S. Vlijanie serosoderzhashhego gaza na drenazhnuju funkciju sistemy mikrocirkuljacii. Morfologija. 2016;149(3):249. (In Russ).]
8. Fukami K., Sekiguchi F., Kawabata A. Hydrogen sulfide and T-type Ca^{2+} channels in pain processing, neuronal differentiation and neuroendocrine secretion. Pharmacology. 2017;99(3-4):196-203.
9. Wallace J. L., Wang R. Hydrogen Sulfide-Based Therapeutics: Exploiting a Unique but Ubiquitous Gasotransmitter. Nat. Rev. Drug Discov. 2015;14(50):329-345.