

**ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЦИТОМЕДИНОВ,
ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ ЖИВОТНЫХ,
ПЕРЕНЕСШИХ КРОВОПОТЕРЮ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ****STUDY OF BIOLOGICAL PROPERTIES OF CYTOMEDINES ISOLATED FROM INNER ORGANS
OF ANIMALS AFTER EXPERIMENTAL BLOOD LOSS**

Ключевые слова: гомеостаз, гемостаз, кровопотеря, CD-маркеры, щелочные полипептиды, печень, сердце, цитомедины, иммунитет, иммунодефицитные состояния.

В ответ на острую кровопотерю в организме развивается комплекс ответных компенсаторно-защитных реакций, имеющих универсальный характер. При острой кровопотере наряду с изменениями в основных интегрирующих системах организма (нервной, кровеносной, эндокринной) отмечаются также закономерные реакции иммунной системы, обусловленные в первую очередь выбросом гормонов стресса. Проведенными исследованиями установлено, что цитомединам наряду со специфическим присуще и неспецифическое влияние. Эксперименты были проведены на 20 животных (бараны): опытные (10 баранов), которым за 5 дней до забоя извлекли 30% объема циркулирующей крови, и контрольные (10 баранов) без кровопускания. Пептиды были выделены методом уксусно-кислой экстракции с последующим осаждением комплекса полипептидов ацетоном по методике В.Г. Морозова и В.Х. Хавинсона. Иммунологические свойства цитомединов, полученных из внутренних органов интактных и перенесших кровопотерю баран, исследовали на 24 образцах крови доноров и 30 образцах крови пациентов с вторичными иммунопатологическими состояниями (in vitro). Установлено, что пептиды, полученные из печени и сердца опытных животных, перенесших кровопотерю, усиливают экспрессию CD3-, CD4-, CD8-маркеров и NK-клеток в краткосрочной культуре. Цитомедины, полученные из тканей интактных животных, усиливали экспрессию CD рецепторов в меньшей степени. Таким образом, цитомедины, выделенные из внутренних органов (сердца и печени) экспериментальных животных, усиливают экспрессию CD3-, CD4-, CD8-маркеров и NK-клеток на лимфоцитах, полученных от больных с вторичными

иммунодефицитными состояниями и являются составными частями единой интегральной клеточно-гуморальной системой защиты организма.

Keywords: homeostasis, hemostasis, blood loss, CD-markers, alkaline polypeptides, liver, heart, cytomedines, immunity, immune deficiency conditions.

In response to acute blood loss, a complex of universal compensative-defense reactions develops in a body. After acute blood loss, along with changes in main integrating systems (nervous, blood circulatory and endocrine systems), regular reactions of immune system are also noted due to stress hormone release. It has been found that cytomedines have both specific and non-specific influence. The experiments were carried out in 20 rams: trial group (10 rams) – 30% of circulating blood was withdrawn 5 days before slaughter. The control group (10 rams) did not undergo blood-letting. Peptides were isolated by using acetic acid-based extraction method followed by acetone sedimentation of polypeptide complex according to V.G. Morozov and V.Kh. Khavinson. Immunological properties of cytomedines derived from inner organs of intact and experimental rams were studied in 24 samples of donors' blood and 30 blood samples of the patients with secondary immunopathological conditions (in vitro). It has been found that peptides derived from the liver and heart of experimental animals undergoing blood loss stimulate expression of CD3-, CD4-, CD8-markers and NK-cells in short-term culture. Cytomedines derived from the tissues of intact animals stimulate expression of CD receptors in a lesser degree. Thus, cytomedines derived from the inner organs (heart and liver) of the experimental animals stimulate expression of CD3-, CD4-, CD8-markers and NK-cells on lymphocytes obtained from patients with secondary immunopathological conditions and constitute the universal cell-humoral system of body protection.

Есаулова Ирина Николаевна, врач-рефлексотерапевт, АУ РБ «Республиканский клинический госпиталь для ветеранов войн», г. Улан-Удэ. Тел.: (3012) 43-73-82. E-mail: esaulova_i@mail.ru.
Абидуева Елена Юрьевна, д.б.н., проф., с.н.с., лаб. микробиологии, Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, г. Улан-Удэ. Тел.: (3012) 43-49-02. E-mail: abidueva_l@mail.ru.

Yesaulova Irina Nikolayevna, Reflexologist, Republican Clinical Hospital for War Veterans, Ulan-Ude. Ph.: (3012) 43-73-82. E-mail: esaulova_i@mail.ru.
Abiduyeva Yelena Yuryevna, Dr. Bio. Sci., Prof., Senior Staff Scientist, Institute of General and Experimental Biology, Sib. Branch of Russian Acad. of Sci., Ulan-Ude. Ph.: (3012) 43-49-02. E-mail: abidueva_l@mail.ru.

Кровопотеря представляет собой комплекс компенсаторных и патологических реакций, возникающих в ответ на кровотечение. К адаптивным механизмам компенсации кровопотери относят активацию свертывающей системы крови и процессы тромбообразования, реакции со стороны сердечно-сосудистой системы, восстановление белкового состава крови, устранение дефицита форменных элементов. В ответ на кровотечение возникает комплекс компенсаторных и патологических реакций [1].

Кровопотеря сопровождается активацией системы иммунитета, что проявляется в появлении «активированных лимфоцитов», увеличением уровня антител, активацией реакции неспецифического иммунитета [2]. Основное место в регуляции системы иммунитета отводится медиаторам в том числе, щелочным полипептидам – цитомедианам, которые являются пептидами межклеточной регуляции и обеспечивают гомеостаз организма. Они образуются в клетках различных органов в результате катепсинового протеолиза, проникают в жидкие среды организма и способны специфическим образом через рецепторы воздействовать на иммунокомпетентные клетки [1, 3-5].

Роль иммунных механизмов в патогенезе критических состояний принципиально важна. Под влиянием экстремального повреждающего воздействия клетки организма высвобождают огромное количество цитокинов – медиаторов (клеточных регуляторов) продолжительности и силы реакций иммунитета и воспаления. Для всех них характерно наличие таких общих свойств, как плейотропность и взаимозаменяемость биологического действия, отсутствие антигенной специфичности, взаимодействие со специфическими рецепторами, формирование цитокиновой сети [6]. В настоящее время известно более 200 клеточных медиаторов, и их список пополняется. При патологии меняется количественный и качественный состав цитомедианов и образованные пептиды принимают участие в адаптивных и саногенетических реакциях организма [7].

Целью исследования явилось изучение биологических свойств эндогенных пептидов (цитомедианов), выделенных из печени и сердца животных, перенесших острую кровопотерю.

Материалы и методы исследования

Эксперименты проведены на 20 животных (бараны). Все животные были разделены на 2 группы: опытные (10 баранов), ко-

торым пунктировали яремные вены и извлекали кровь в объеме, равном 30% ОЦК за 5 дней до забоя и контрольные без предварительного кровопускания (10 баранов). Экспериментальную работу проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение 4 к Приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.77), «Правилами, принятыми в Европейской конвенции по защите позвоночных животных» (Страсбург, 1986).

Для получения цитомедианов были взяты внутренние органы баранов – ткани печени и сердца. Выделение цитомедианов проводилось методом уксусно-кислой экстракции с последующим осаждением комплекса полипептидов ацетоном (Морозов В.Г., Хавинсон В.Х., 1999).

Нами исследовалась биологическая активность цитомедианов на 24 образцах крови доноров (16 мужчин и 8 женщин) в возрасте от 31 до 55 лет (средний возраст $39,6 \pm 1,7$), не имеющих соматических, психических заболеваний, и 30 образцах крови пациентов с вторичными иммунопатологическими состояниями (20 мужчин и 10 женщин) в возрасте от 19 до 59 лет (средний возраст $40,4 \pm 2,4$). Группа больных представлена пациентами АУ РБ «Республиканский клинический госпиталь для ветеранов войн», ГАУЗ «Республиканская клиническая больница им. Н.А. Семашко» г. Улан-Удэ. У всех больных диагноз ХОБЛ (хроническая обструктивная болезнь легких) подтвержден данными анамнеза, клиники, функциональных и рентгенологических методов исследований в соответствии с Федеральной программой по ХОБЛ (Москва, 2004), рекомендациями Европейского респираторного общества по ХОБЛ (Consensus Statement of the European Respiratory Society, 2003), GOLD (Global Initiative for Obstructive Lung Disease, 2008). Наличие вторичного иммунодефицитного состояния выявлялось по результатам иммунологических исследований.

Перед проведением исследования полученные пептиды растворяли в соотношении 100 мкг в 1,0 мл физиологического раствора. Лимфоциты выделялись на градиенте фикоколл-урографин с плотностью $1,077 \text{ г/см}^3$, дважды отмывались средой 199 или раствором Хенкса и инкубировали 0,1 мл раствора пептидов в течение 60 мин. при $+37^\circ\text{C}$. Выявление поверхностных маркеров лимфоцитов (CD3+, CD4+, CD8+, CD22+ и CD16+) проводили с помощью моноклональных антител реакцией

иммунофлюоресценции (РИФ). Использовали моноклональные антитела (ТОО «МедБиоСпектр», Москва). Оценку реакции осуществляли по проценту светящихся клеток. В качестве контроля проводили аналогичные тесты с введением физиологического раствора.

Полученные данные были обработаны статистически общепринятыми методами с применением пакета прикладной программы «BIOSTAT» и программы статистического анализа Microsoft Excel, версия XP. Исследуемые параметры приведены в виде средних величин со стандартным отклонением $M \pm SD$, где M – среднее значение, SD – среднее квадратичное отклонение. Показатель достоверности вычислялся с помощью рангового непараметрического

критерия Манна-Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждения

Известно, что введение цитомединов в организм существенным образом меняет иммунологический потенциал. Поэтому мы оценили биологические свойства пептидов, выделенных из печени и сердца как интактных, так и перенесших кровопотерю баранов. Причем, лимфоциты – индикаторы выделяли из крови как доноров, так и больных с явлениями иммунодефицита.

Полученные результаты представлены в таблице 1.

Установлено, что пептиды, выделенные из печени, практически не оказывают эффекта на экспрессию CD-маркеров лимфоцитов доноров.

Таблица 1

Влияние пептидов из печени животных, полученных до и после кровопотери на экспрессию CD-маркеров лимфоцитов доноров и больных ($M \pm SD$)

Исследуемые показатели ($\times 10^3$ кл/мкл)	Исследования		
	1	2	3
Лимфоциты доноров			
	Физиологический раствор (контроль) n=24	Контрольные пептиды (опыт I) n=24	Опытные пептиды (опыт II) n=24
Т-лимфоциты CD3+	0,61 ± 0,09	0,58 ± 0,10	0,53 ± 0,12
Т-хелперы CD4+	0,48 ± 0,04	0,47 ± 0,11	0,5 ± 0,10
Т-лимфоциты CD8+	0,33 ± 0,07	0,35 ± 0,06	0,31 ± 0,05
В-лимфоциты CD22+	0,31 ± 0,04	0,37 ± 0,13	0,38 ± 0,11
NKCD16+		0,27 ± 0,10	0,29 ± 0,12
p ₁	0,41 ± 0,07	<0,05	
p ₂			<0,05
p ₃			<0,05
Лимфоциты больных			
	Физиологический раствор (контроль) n=30	Контрольные пептиды (опыт I) n=30	Опытные пептиды (опыт II) n=30
Т-лимфоциты CD3+		1,01 ± 0,18	1,06 ± 0,12
p ₁	0,63 ± 0,21	<0,05	
p ₂			<0,05
p ₃			<0,05
Т-хелперы CD4+		0,72 ± 0,20	0,76 ± 0,21
p ₁	0,41 ± 0,12	<0,05	
p ₂			<0,05
p ₃			<0,05
Т-лимфоциты CD8+		0,38 ± 0,03	0,37 ± 0,08
p ₁	0,24 ± 0,06	<0,05	
p ₂			<0,05
p ₃			<0,05
В-лимфоциты CD22+	0,26 ± 0,03	0,41 ± 0,21	0,35 ± 0,09
NKCD16+		0,51 ± 0,08	0,45 ± 0,06
p ₁	0,23 ± 0,05	<0,05	
p ₂			<0,05
p ₃			<0,05

Примечание. p₁ – достоверность различий между контролем и опытом I; p₂ – достоверность различий между опытом I и опытом II; p₃ – достоверность различий между контролем и опытом II.

Несколько иная картина обнаруживается при анализе результатов исследования лимфоцитов, полученных больных ХОБЛ. Оказалось, что интактные цитомедины усиливают экспрессию маркеров CD3+ ($p_1 < 0,05$), CD4+ ($p_1 < 0,01$), CD8+ ($p_1 < 0,02$), CD16+ ($p_1 < 0,05$). Вместе с тем подобный эффект выявлен и у опытных цитомединов. Так пептиды, выделенные из печени баранов, перенесших кровопотерю, усиливают по сравнению с исходными данными экспрессию маркеров CD3+ ($p_3 < 0,05$), CD4+ ($p_3 < 0,05$), CD8+ ($p_3 < 0,05$), CD16+ ($p_3 < 0,05$).

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что пептиды печени интактных и опытных баранов способны менять экспрессию CD-маркеров в большей степени на лимфоцитах, выделенных из крови пациентов.

В таблице 2 представлены результаты экспериментов по изучению экспрессии CD-маркеров лимфоцитов, выделенных из крови доноров при стимуляции цитомединами, полученными из сердца интактных, а также перенесших кровопотерю баранов.

Таблица 2

Влияние пептидов из сердца животных, полученных до и после кровопотери на экспрессию CD-маркеров лимфоцитов доноров и больных ($M \pm SD$)

Изучаемые показатели ($\times 10^3$ кл./мкл)	Исследования		
	1	2	3
Лимфоциты доноров			
	Физиологический раствор (контроль) n=24	Контрольные пептиды (опыт I) n=24	Опытные пептиды (опыт II) n=24
Т-лимфоциты CD3+	0,61 \pm 0,09	0,6 \pm 0,05	0,63 \pm 0,07
Т-хелперы CD4+	0,48 \pm 0,04	0,51 \pm 0,06	0,53 \pm 0,05
Т-лимфоциты CD8+			0,42 \pm 0,08
P ₁	0,33 \pm 0,07	0,35 \pm 0,04	
P ₂			<0,05
P ₃			
В-лимфоциты CD22+	0,31 \pm 0,04	0,35 \pm 0,04	0,37 \pm 0,07
NKCD16+		0,23 \pm 0,04	0,52 \pm 0,03
P ₁	0,41 \pm 0,07	<0,001	<0,05
P ₂			<0,05
P ₃			<0,05
Лимфоциты больных			
	Физиологический раствор (контроль) n=30	Контрольные пептиды (опыт I) n=30	Опытные пептиды (опыт II) n=30
Т-лимфоциты CD3+			0,92 \pm 0,15
P ₁	0,63 \pm 0,21	0,86 \pm 0,39	<0,05
P ₂		<0,05	<0,05
P ₃			<0,05
Т-хелперы CD4+		0,54 \pm 0,21	0,68 \pm 0,09
P ₁	0,41 \pm 0,12	<0,05	<0,05
P ₂			<0,05
P ₃			<0,05
Т-лимфоциты CD8+		0,39 \pm 0,08	0,49 \pm 0,10
P ₁	0,24 \pm 0,06	<0,05	<0,05
P ₂			<0,05
P ₃			<0,05
В-лимфоциты CD22+		0,29 \pm 0,06	0,34 \pm 0,11
P ₁	0,26 \pm 0,03		<0,05
P ₂			
P ₃			
NKCD16+		0,35 \pm 0,12	0,49 \pm 0,06
P ₁	0,23 \pm 0,05	<0,05	<0,05
P ₂			<0,05
P ₃			<0,05

Примечание. Условные обозначения те же, что и в таблице 1.

Наши наблюдения показали, что выраженного сдвига общего количества Т- и В-лимфоцитов, а также различных их популяций не произошло. Однако зарегистрированы изменения при инкубации пептидов из сердца баранов до кровопотери с лимфоцитами доноров. Так, число клеток, несущих маркеры CD16+, уменьшается ($p_1 < 0,001$) и увеличивается при инкубации с пептидами из сердца баранов после кровопотери CD16+ ($p_2 < 0,05$; $p_3 < 0,05$) и CD8+ ($p_3 < 0,05$).

Далее нами было показано, что инкубация пептидов из сердца баранов с лимфоцитами больных ХОБЛ приводит к выраженным сдвигам в экспрессии CD-маркеров лимфоцитов (табл. 2). Это в полной мере относится к цитомединам, полученным из сердца интактных баранов, которые после инкубации увеличивали маркеры CD3+, CD4+, CD8+, CD16+ ($p_1 < 0,05$). Пептиды, полученные из сердца опытных животных, еще в большей степени увеличивали содержание маркеров CD3+, CD4+, CD8+ и CD16+ ($p_2 < 0,05$; $p_3 < 0,05$), а также CD22+ ($p_3 < 0,05$).

Таким образом, проведенное исследование показало, что биологическая активность цитомединов, полученных из печени и сердца животных, перенесших острую кровопотерю, отлична от свойств регуляторных пептидов, полученных от интактных животных.

Выводы

1. Полученные данные свидетельствуют о том, что пептиды, выделенные из печени интактных животных, увеличивают содержание маркеров CD4+ лимфоцитов доноров и повышают количество клеток, несущих маркеры CD3+, CD4+, CD8+ и CD16+, полученных от больных с вторичными иммунодефицитами.

2. Пептиды, выделенные из сердца животных, перенесших кровопотерю, увеличивают число маркеров CD8+ и CD 16+ – лимфоцитов больных ХОБЛ.

Библиографический список

1. Острая массивная кровопотеря / А.И. Воробьев, В.М. Городецкий, Е.М. Шулуток и др. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2001. – 176 с.

2. Кузник Б.И. Физиология и патология системы крови. – 4-е изд. – Чита: ООО «Типография газеты «Ваша реклама», 2004. – 336 с.

3. Кузник Б.И. Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и патологии: монография. – Чита: Экспресс-издательство, 2010. – 832 с.

4. Сепиашвили Р.И., Балмасова И.П. Физиология естественных киллеров. – М.: Медицина-Здоровье, 2005. – 456 с.

5. Хаитов Р.М., Манько В.М. Физиологические особенности активации и торможения функции клеток иммунной системы // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2006. – № 6. – С. 662-676.

6. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. – СПб.: Фолиант, 2008. – 550 с.

7. Хавинсон В.Х., Анисимов В.Н. 35-летний опыт исследований пептидной регуляции старения // Успехи геронтол. – 2009. – Т. 22. – № 1. – С. 11-23.

References

1. Ostraya massivnaya krvopoterya / A.I. Vorobev, V.M. Gorodetskiy, E.M. Shulutko i dr. – M.: GEOTAR-MED, 2001. – 176 s.

2. Kuznik B.I. Fiziologiya i patologiya sistemy krovi. – 4-e izd. – Chita: ООО «Типография газеты «Vasha reklama», 2004. – 336 s.

3. Kuznik B.I. Kletochnye i molekulyarnye mekhanizmy regulyatsii sistemy gemostaza v norme i patologii: monografiya. – Chita: Ekspress-izdatelstvo, 2010. – 832 s.

4. Sepiashvili R.I., Balmasova I.P. Fiziologiya estestvennykh killerov. – M.: Meditsina-Zdorove, 2005. – 456 s.

5. Khaïtov R.M., Manko V.M. Fiziologicheskie osobennosti aktivatsii i tormozheniya funktsii kletok immunnoy sistemy // Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurn. im. I.M. Sechenova. – 2006. – № 6. – S. 662-676.

6. Ketlinskiy S.A., Simbirtsev A.S. Tsitokiny. – SPb.: Foliant, 2008. – 550 s.

7. Khavinson V.Kh., Anisimov V.N. 35-letniy opyt issledovaniy peptidnoy regulyatsii stareniya // Uspekhi gerontol. – 2009. – T. 22, № 1. – S. 11-23.

