

ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ ЭРИТРОЦИТОВ С ИХ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТЬЮ НА ФОНЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ФИЗИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ

© Долгарева С.А., Конопля А.И., Гаврилюк В.П., *Солошенко А.В.,
*Жарко С.В., **Ярош А.Л., Быстрова Н.А.

Кафедра физики, информатики и математики, кафедра биологической химии
Курского государственного медицинского университета, Курск;
*Белгородская областная клиническая больница Святителя Иоасафа, Белгород;
**кафедра хирургических болезней № 1 медицинского факультета
Белгородского государственного университета, Белгород
E-mail: wvas1983@mail.ru

В условиях экспериментального гнойного холангита установлены изменения структурно-функциональных свойств эритроцитов и их иммуномодулирующих свойств на фоне воздействия физиотерапевтических факторов. Использование ультразвукового воздействия, а в большей степени магнитно-инфракрасно-лазерного воздействия на область селезенки нормализовало и корригировало ряд нарушенных показателей структурно-функциональных свойств эритроцитов, что обуславливает перспективность использования данных физиотерапевтических факторов воздействия в качестве средств регуляции иммунотропных свойств эритроцитов как в норме, так и в условиях патологии.

Ключевые слова: экспериментальный гнойный холангит, ультразвуковое воздействие, магнитно-инфракрасно-лазерное воздействие, иммунотропные эффекты.

COMMUNICATION OF MEMBRANOUS PROTEINS OF ERYTHROCYTES WITH THEIR IMMUNOMODULATING ACTIVITY AT INFLUENCE OF PHYSICAL FACTORS

*Dolgareva S.A., Konoplya A.I., Gavriilyuk V.P., Soloshenko A.V.,
Zharko S.V., Yarosh A.L., Bystrova N.A.*

Department of Physics, Computer Science and Mathematics, Biochemistry Department
of the Kursk State Medical University, Kursk;
Belgorod Regional Hospital of the Sainted Ioasaph, Belgorod;
Surgery N 1 Department of Medical Faculty of the Belgorod State University, Belgorod

At an experimental purulent cholangitis changes of structural and functional properties of erythrocytes, their immunomodulating properties against influence of physiotherapeutic factors are established. Ultrasound application and more over magnitno-infrakrasno-laser influence on lien area normalised and corrected the broken indicators of structural and functional properties of erythrocytes. It gives an opportunity to use the physiotherapeutic influence as regulation agents of immunomodulating properties of erythrocytes both in normal and in pathological conditions.

Key words: an experimental purulent cholangitis, ultrasonic influence, magnitno-infrakrasno-laser influence, immunomodulating effects.

Поиск средств эффективной стимуляции и супрессии иммуногенеза тесно связан с изучением функций клеточных элементов лимфоидной ткани в развитии иммунологических реакций организма. Имеющиеся в настоящее время данные позволяют предположить, что существенную роль в регуляции иммуногенеза, особенно в условиях патологии, характеризующейся развитием вторичного иммунодефицита, играют эритроциты [7]. Высказыва-

ются мнения о наличии типовых физико-химических и структурно-функциональных изменений в эритроцитах в условиях различной патологии, являющихся звеньями одной цепи каскада патофизиологических реакций, которые имеют место при той или иной нозологии [8].

Анализ отечественной и зарубежной литературы показывает, что, несмотря на достигнутые значительные успехи современной

клинической иммунологии в изучении функционирования иммунной системы, по-прежнему недостаточно изученными остаются молекулярно-генетические аспекты исследования взаимосвязи мембранных белков эритроцитов с иммуномодулирующей их активностью после воздействия физическими факторами, такими как ультразвуковое (УЗ) и магнитно-инфракрасно-лазерное (МИЛ) воздействия.

В связи с этим целью исследования явилось изучение характера и выраженности изменений структурно-функциональных свойств эритроцитов их иммуномодулирующих свойств в условиях экспериментального гнойного холангита на фоне воздействия физиотерапевтических факторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальная часть исследований проведена на 192 крысах Вистар массой 180–200 г. Все животные содержались в одинаковых условиях, на обычном пищевом режиме. Для получения статистически достоверных результатов группы формировали из 13–16 животных. В контрольные и опытные группы входили животные одного возраста, полученные из питомника одновременно. Разброс в группах по исходной массе не превышал $\pm 10\%$. Все исследования проводили в одно и то же время суток с 8 до 12 ч. с соблюдением принципов, изложенных в Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей (г. Страсбург, Франция, 1986).

Острый гнойный холангит (ЭГХ) моделировали по Г.Г. Ахаладзе [1] в модификации С.В. Костина с соавт. [3]: инъекционным путем в проксимальном направлении в общий желчный проток вводилась микробная взвесь штамма № 195 гемолитической *E. coli* в концентрации $1 \cdot 10^5$ КОЕ в 1 мл физиологического раствора в дозе 0,2 мл/кг массы, сразу после введения проводилась перевязка протока на игле выше места пункции.

Ультразвуковое воздействие проводили с использованием ультразвукового аппарата "УЗТ – 1.01" при частоте 0,88 мГц, плотности потока мощности 0,4 Вт/см² в непрерывном режиме, а магнитно-инфракрасно-лазерное

воздействие с использованием аппарата "МИЛТА-Ф-5-01" при частоте 50 Гц и мощности светодиода 50 мВт. В обоих случаях воздействие производилось на область селезенки 4 раза с интервалом 24 часа контактно в течение 120 секунд.

Эритроциты получали из 5 мл гепаринизированной крови по методу E. Beutler [12]. Определяли сорбционную способность эритроцитов (ССЭ) по отношению к витальным красителям [10] и сорбционную емкость их гликокаликса (СЕК) [9]. О функциональном состоянии эритроцитов судили также по содержанию в них малонового диальдегида (МДА) [5].

Мембраны эритроцитов получали методом G.T. Dodge [15]. Электрофорез проводили в присутствии додецилсульфата натрия в вертикальных пластинах полиакриламидного геля по методу U.K. Laemmli [15]. Белки окрашивали кумаси голубым R-250 по модифицированной методике G. Fairbanks [14]. Количественное содержание белковых фракций рассчитывали через площадь и известную концентрацию яичного альбумина, выступающего как маркерный белок.

Для развития гуморального иммунного ответа (ГИО) эритроциты барана (ЭБ) вводили внутривентриально однократно из расчета 2×10^9 клеток на 1 кг массы тела. Выраженность ГИО оценивали на пятые сутки после иммунизации путем определения в селезенке числа АОК [6].

Гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ) у крыс индуцировали внутривентриальным введением 10^8 ЭБ в 0,5 мл 0,15 М раствора натрия хлорида (сенсibiliзирующая доза). Через 4 суток в подушечку стопы правой лапки вводили 10^6 ЭБ в 0,1 мл физиологического раствора (разрешающая доза). О выраженности ГЗТ судили по разнице масс регионарного (РМ) и контрлатерального лимфатических узлов (РК) [11].

Статистическую обработку результатов исследования проводили, используя непараметрические методы: критерии Вилкоксона-Манна и Уитни, Крускала-Уоллиса, Фридмана и непараметрический вариант критерия Ньюмена-Кейлса [4].

Изменение ГИО и ГЗТ, индуцированного ЭБ, у крыс с экспериментальным гнойным холангитом ($M \pm m$)

№ п/п	Условия опыта	Время после воспроизведения, сутки	АОК	PM	PK
1	Здоровые животные	—	20,4±3,1	1,8±0,12	0,85±0,09
2	Изолированная лапаротомия	3	22,4±3,6	1,9±0,15	0,78±0,09
3	Изолированная лапаротомия	5	21,5±3,7	1,8±0,14	0,75±0,08
4	ЭГХ	1	16,1±2,3	1,35±0,12 ^{*1-3}	0,71±0,07 ^{*1-3}
5	ЭГХ	2	14,4±2,1 ^{*1-3}	1,29±0,13 ^{*1-3}	0,71±0,08 ^{*1-3}
6	ЭГХ	3	11,3±0,4 ^{*1-5}	1,00±0,12 ^{*1-3}	0,39±0,05 ^{*1-5}
7	ЭГХ	4	10,5±1,7 ^{*1-5}	0,53±0,11 ^{*1-6}	0,37±0,05 ^{*1-5}
8	ЭГХ	5	8,5±1,4 ^{*1-6}	0,51±0,10 ^{*1-6}	0,35±0,04 ^{*1-5}

Примечание: звездочкой отмечены достоверные отличия средних арифметических ($p < 0,05$); цифры рядом со звездочкой – по отношению к показателям какой группы эти различия.



Рис. 1. Представительность белков мембраны эритроцитов и их сорбционные свойства у животных с ЭГХ на 5-е сутки моделирования.

Примечание: ○ – $p < 0,05$ между показателями по отношению к контрольной группе.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ
И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что на 1-е сутки после воспроизведения гнойного холангита формирование ГИО статистически не отличалось от контроля (животные только иммунизированные ЭБ или подвергнутые изолированной лапаротомии) (табл. 1).

На 2-е сутки наблюдалось достоверное снижение АОК в 1,6 раза по сравнению с контролем, а на 3–4-е сутки после операции выявлено дальнейшее угнетение ГИО на ЭБ, что проявлялось снижением в селезенке оперированных крыс числа иммунных АОК в 2 и 2,2 раза соответственно. На 5-е сутки после операции выявлялась максимальная иммуносупрессия: снижение количества АОК в 2,8 раза по сравнению с группой контроля.

Было установлено, что, в отличие от ГИО, показатели ГЗТ у крыс с экспериментальным гнойным холангитом уже на 1-е сутки после операции воспроизведения ЭГХ значительно снижались по сравнению с группой здоровых доноров. Об этом свидетельствовало достоверное уменьшение разницы масс регионарных и контрлатеральных лимфоузлов крыс в 1,4 раза и разницы количества в них кариоцитов в 1,2 раза (табл. 1).

На 2-е и 3-и сутки после операции происходило снижение РМ и РК в 1,8 и 2,3 раза соответственно, что указывало на прогрессирующую иммуносупрессию. Наиболее выраженное ингибирование развития ГЗТ наблюдалось на 4-е и 5-е сутки после операции, о чем свидетельствовало снижение РМ в 3,4 и

3,5 раза, РК в 2,3 и 2,4 раза соответственно, по сравнению с животными группы контроля (табл. 1).

На 5-е сутки после моделирования гнойного холангита, т.е. в период максимальной иммуносупрессии, у животных выявлено увеличение ССЭ и СЕГ, концентрации МДА, представительности анионтранспортного белка (или белка полосы 3; на 21,1%), β -спектрина (на 16,0%) и белка полосы 4.5 (на 57,8), но уменьшение представительности анкирин и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (на 39,6%) (рис. 2). Использование после моделирования ЭГХ ультразвукового воздействия на область селезенки нормализовало содержание в эритроцитарной мембране β -спектрина и анкирина и корригировало представительность белка полосы 4.5, а магнито-инфракрасно-лазерного воздействия – дополнительно нормализовало представительность ГЗФД и корригировало ССЭ (табл. 2).

Инъекции животным с ЭГХ эритроцитов, подвергнутых воздействию УЗ (*in vitro*), корригировали содержание в мембране анкирина, β -спектрина, не влияя на сорбционные свойства эритроцитов и концентрацию в них МДА. Эритроциты, обработанные МИЛ, при введении их животным с ЭГХ нормализуют содержание в эритроцитарной мембране β -спектрина, корригируют концентрацию анкирина, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, ССЭ, СЕГ. Таким образом, введение интактным животным аллогенных эритроцитов, подвергнутых воздействию физиотерапевтическими факторами, корригируют физико-

Таблица 2

Представительность белков мембраны эритроцитов и их сорбционные свойства у животных с ЭГХ, подвергнутых воздействию УЗ или МИЛ

Белок (полоса)	Эритроциты животных с ЭГХ на 5-е сутки		
	Без воздействия	+ УЗ	+ МИЛ
β -спектрин (1 β)	↑	нормализация	нормализация
Анкирин	↓		
Анионтранспортный белок (3)	↑	–	–
Белок полосы 4.5 (4.5)	↑	коррекция	коррекция
Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (6)	↓	–	нормализация
СЕГ	↑		–
ССЭ	↑		коррекция
МДА	↑		–

химические свойства эритроцитов в условиях ЭГХ.

Эритроциты, циркулирующие в сосудистом русле, неоднородны по возрасту. В процессе старения в клетках активируются фосфолипиды С и А₂, ускоряется липолиз, увеличивается содержание диацилглицерола и лизофосфатидхолина, нарушаются белок-липидные взаимодействия. Старение сопровождается структурной модификацией спектрина и агрегацией белков полосы 3, индуцирующих изменение антигенных детерминант мембраны, и узнаванием старых эритроцитов макрофагами [2].

При стрессе или патологии наблюдающиеся выраженные изменения метаболизма в эритроцитах обусловлены интенсивностью репликативных процессов в костномозговых предшественниках "молодых" (легких) эритроцитов, выходящих в сосудистое русло, и генетической незащищенностью "старых" (тяжелых) клеток [7]. Наряду с принципиально общими изменениями метаболического статуса эритроцитов при состояниях, характеризующихся выраженным стрессорным компонентом, имеют место специфические для каждого из них особенности, обусловленные природой индуцирующего агента и первичным звеном его воздействия на клетки и организм в целом. Общность направленности и в значительной мере выраженности сдвигов, наблюдающихся при различных формах стресса и патологии, сочетается с неодинаковой эффективностью действия различных фармакологических препаратов и немедикаментозных (физиотерапевтических) средств иммунокоррекции [8].

Как показали данные исследования, действие физических факторов, таких как ультразвук и магнитно-инфракрасно-лазерное воздействие, на мембрану эритроцитов нивелирует изменения у них иммуотропных свойств, а также изменяет их чувствительность к действию агентов, индуцирующих появление иммуномодулирующих свойств, что обуславливает перспективность использования данных физиотерапевтических факторов воздействия в качестве средств регуляции иммуномодулирующих свойств эритроцитов как в норме, так и, что более важно, в условиях патологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ахаладзе Г.Г. Гнойный холангит // 50 лекций по хирургии / под ред. В.С. Савельева. – М.: Медиасфера, 2002. – С. 125-131.
2. Конопля А.И. Взаимосвязь структуры и функции эритроцитов с иммунным гомеостазом. – Курск: КГМУ, 2008. – 40 с.
3. Костин С.В., Локтионов А.Л., Конопля А.И. и др. Нарушения фагоцитарного звена системы антиинфекционной защиты при экспериментальном холангите и панкреатите // Успехи современного естествознания. – 2003. – № 8. – С. 61.
4. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1980. – 243 с.
5. Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования в клинике: справочник. – М.: Медицина, 1987. – 365 с.
6. Мальберг К., Зигль Э. Метод локального гемолиза // Иммунологические методы. – М.: Медицина, 1987. – С. 262-267.
7. Прокопенко Л.Г., Лазарев А.И., Бровкина И.Л. и др. Эритроцитзависимые эффекты лекарственных и физиотерапевтических средств. – Курск: КГМУ, 2008. – 336 с.
8. Рязанцева Н.В., Новицкий В.В. Типовые нарушения молекулярной организации мембраны эритроцита при соматической и психической патологии // Успехи физиологических наук. – 2004. – Т. 1, № 1. – С. 53-65.
9. Семко Г.А. Структурно-функциональные изменения мембран и внешних примембранных слоев эритроцитов при гиперэпидермопозе // Украинский биохимический журнал. – 1998. – Т. 70, № 3. – С. 113-118.
10. Тогайбаев А.А., Кургузкин А.В., Рикун И.В. Способ диагностики эндогенной интоксикации // Лаб. дело. – 1988. – № 9. – С. 22-24.
11. Федосеева Т.В., Порядин Л.В., Ковальчук Л.В. и др. Руководство по иммунологическим методам в гигиенических исследованиях. – М., 1993. – С. 319.
12. Beutler E. How do red cell enzymes age a new perspective // Brit. J. Haemat. – 1985. – V. 61. – P. 377-384.
13. Dodge G.T., Mitchell C., Hanahan D.J. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin free ghosts of human erythrocytes // Arch. Biochem. Biophys. – 1963. – V. 100. – P. 119-130.
14. Fairbanks G., Steck T., Wallach D. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane // Biochemistry. – 1971. – V. 10. – P. 2606-2616.
15. Laemli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – V. 227. – P. 680.