
Особенности влияния адреналина на перекисное окисление липидов в миелокариocyтах зрелых и старых крыс *in vitro*

Щербаков Д.Л., Емельянов В.В., Мещанинов В.Н.

ГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет»

Минздрава России, Екатеринбург

ГБУЗСО Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург

ФГАОУ ВПО «Уральский федеральный университет имени

первого Президента России Б.Н. Ельцина», Екатеринбург

Актуальность. По мнению ряда ученых, на реализацию процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в организме могут влиять некоторые гормоны и нейромедиаторы [3, 8]. Одним из таких веществ является адреналин, участвующий в реализации стресс-реакции организма на экстремальное воздействие [16]. Известно, что адреналин инициирует катаболические реакции в организме с активацией гидролитических ферментов [13]. В результате этого процесса происходит высвобождение свободных жирных кислот из липидного бислоя клеточных мембран. Свободные жирные кислоты являются легкодоступным субстратом для процессов ПОЛ и могут вызывать его активацию с последующим повреждением клеток [1].

Основным субстратом для реализации процессов ПОЛ в организме служат липиды. По мнению ряда ученых, изменение жирнокислотного состава липидов мембран клеток может влиять на интенсивность протекания процессов ПОЛ. Известно, что с возрастом, возможно, происходит изменение соотношения состава липидов мембранных структур, выражающееся в увеличении доли трудноокисляемых липидов (холестерин, насыщенные жирные кислоты), что может сопровождаться снижением скорости образования липоперекисей [2, 9, 12, 18].

Красный костный мозг состоит в большей своей части из кроветворной миелоидной ткани, основными клеточными элементами которой являются миелокариocyты – ядросодержащие клетки гемопоэза. Ряд авторов отмечает возрастзависимое уменьшение содержания стволовых кроветворных клеток в периферической крови [1, 11]. Возможно, введение в организм стволовых клеток костномозгового происхождения способно снизить темп его старения и увеличить продолжительность жизни.

Известно много различных механизмов, контролирующих гемопоэз в костном мозге. Один из них это регуляторное влияние аднергической системы на гемопоэз при стрессе, где ключевую роль играют механизмы воздействия агонистов и антогонистов на α - и β -адренорецепторы [15, 16, 17]. Однако, о том, как влияет адреналин на стволовые клетки, в литературе информации недостаточно [16]. По нашему предположению, воздействие адреналина может повлечь за собой повышение интенсивности ПОЛ

в клетках с последующими негативными эффектами. В связи с этим при пересадке костного мозга и стволовых клеток в организмы разного возраста важной научно-практической задачей следует считать их направленную модификацию с помощью биологически активных веществ, фармпрепаратов и особенно — антиоксидантов.

Цель исследования: охарактеризовать влияние адреналина на динамику перекисного окисления липидов в миелокариоцитах крыс разного возраста в условиях их инкубации *in vitro*.

Материалы и методы исследования. Исследования проводились на костном мозге, полученном от крыс-самцов линии Вистар зрелого возраста (8–10 месяцев, массой 200–250 г.) и старого возраста (19–22 месяца, массой 400–500 г.), общим количеством 30 животных (таблица 1).

Таблица 1
Проведенные эксперименты
и количество использованных в них животных

	зрелые крысы	старые крысы
1. Исследование динамики ПОЛ в миелокариоцитах крыс при инкубации с адреналином (хемилюминисцентный анализ с индуцированием H_2O_2)	10	10
2. Исследование динамики свечения (биолюминесценции) в миелокариоцитах при инкубации с адреналином (хемилюминисцентный анализ без индуцирования H_2O_2)	5	5
Итого:		30

Забой животных осуществлялся путем декапитации под эфирным рауш-наркозом. Костный мозг извлекался из бедренных костей промыванием холодным ($t=4^\circ C$) физиологическим раствором. После этого костный мозг отмывали от жировых элементов физиологическим раствором и центрифугировали на холоде при частоте 3000 об/мин. Затем миелокариоциты отделяли от других фракций и ресуспендировали в физиологическом растворе с помощью игл уменьшающегося диаметра, после чего следовало 2 повторных центрифугирования с предварительным ресуспендированием осадка миелокариоцитов [2, 15]. Далее с использованием камеры Горяева подсчитывали количество миелокариоцитов и с помощью среды Игла («ПИПЭВ им. Чумакова», Россия) доводили концентрацию клеток до 4×10^7 клеток/мл. Жизнеспособность клеток определяли по проценту окрашенных (0,4% раствором трипанового синего) в камере Горяева. Все манипуляции с клетками проводили при температуре $4^\circ C$.

Медицинский адреналин («Московский эндокринный завод», Россия) для эксперимента брали из запаянных ампул и разводили средой Игла до концентрации $1,9 \times 10^8$ молекул/мл, из расчета 4 молекулы адреналина на 1 клетку.

Для оценки уровня ПОЛ в миелокариоцитах был применен хемилюминисцентный метод [4, 12]. Измерения проводились с помощью хемилюминетра ХЛ 1420.1 (ТОО «Конструктор», Россия) и люцинометра — фото-

метра Lucy 3 с двойным диспенсером и встроенным компьютером (Anthos Labtec Instruments, США). 0,5–1 мл исследуемого материала вносили в термостатируемую затемненную кюветную камеру люминометра, снабженную мешалкой для перемешивания пробы; доводили до температуры 37 °С; записывали фоновое значение свечения после открытия шторки прибора, разделяющей кювету и ФЭУ. Затем в пробу вводили 0,5 мл 3 % H₂O₂ для стимуляции ПОЛ в стандартных условиях. Хемилиюминесценцию (ХЛ) регистрировали в течение 90–180 секунд в виде кривой, отражающей зависимость интенсивности ХЛ от времени. По окончании заданного времени регистрации компьютерная программа «Диагност» рассчитывала в относительных единицах амплитуду и светосумму ХЛ. Амплитуда (h) ХЛ отражает в основном содержание в пробе легкодоступных для окисления соединений, светосумма (SS) ХЛ — соотношение в пробе про- и антиоксидантов. Из полученных данных рассчитывался коэффициент перекисного окисления липидов (КПОЛ) по разработанной нами формуле:

$$\text{КПОЛ} = \frac{200 \cdot (\Sigma SS \cdot h_{\text{к}} - (SS \cdot h_{\text{о}}))}{(\text{сред. } (SS \cdot h)_{\text{с.к.}} + \text{сред. } (SS \cdot h)_{\text{н.к.}})}$$

SS - светосумма
 h - высота максимума световысходяющей кривой
 к - контроль (старые или зрелые крысы)
 о - опыт (старые или зрелые крысы)
 з - зрелые крысы
 с - старые крысы

среднее значение по всем контрольным группам, в старым, и зрелым или среднее значение по всей выборке

Экспериментальная часть была разделена на две стадии (таблица 1). На первой стадии изучалась динамика ПОЛ в миелокариocyтах при инкубации с адреналином. Отмытые и разведенные миелокариocyты от каждой интактной крысы разделяли на 12 проб, по 0,5 мл в каждой пробе. Измерение ХЛ проводили после добавления в пробу адреналина с последующим индуцированием H₂O₂ на 5 с., 10 с., 20 с. и т.д. Общее время инкубации — 2 часа.

На второй стадии изучали биолюминесценцию миелокариocyтов после добавления адреналина без индуцирования H₂O₂. Миелокариocyты от каждой интактной крысы разделялись на 6 проб по 1 мл в пробе. Адреналин добавляли в пробу на 5 с инкубации. Каждое измерение проводилось в течение 90 с. в первом контрольном опыте вместо адреналина использовалась среда Игла. Во втором контрольном опыте вместо миелокариocyтов использовалась среда Игла.

Полученные результаты подвергали статистической обработке в программном пакете Statistica 10 for Windows и в программе MS Excel 2007 с использованием непараметрических критериев Уилкоксона и Манна-Уитни. Критерием статистической значимости различий сравниваемых средних величин считали p < 0,05, либо p = 0,05 [9].

Результаты и их обсуждение. В миелокариocyтах контрольных зрелых крыс *in vitro* величина КПОЛ была больше на 8% (p < 0,05), по сравнению с миелокариocyтами старых крыс (таблица 2). Полученный результат можно объяснить тем, что с возрастом в красном костном мозге крыс уве-

личивается доля липидной составляющей с преобладанием холестерина и других слабоокисляемых липидов (насыщенные жирные кислоты), которые препятствуют процессу липопероксидации.

Таблица 2
Динамика КПОЛ в миелокариоцитах старых и зрелых крыс при инкубации с адреналином *in vitro* в условиях индуцирования H₂O₂

Время (с) \ Группы	Миелокарициты старых крыс	Миелокарициты зрелых крыс
контроль	96,3 ± 2,2	103,7 ± 1,9 **
5	109,3 ± 9,9 *	123,4 ± 4,9*
10	124,8 ± 8,5 *	122,4 ± 6,1*
20	123,2 ± 2,9 *	116,9 ± 3,5*
40	114,9 ± 5,0 *	115,8 ± 2,4*
60	113,6 ± 3,3	116,5 ± 0,3*
180	82,4 ± 8,8 *	105, ± 3,0**
600	76,2 ± 4,1*	107,9 ± 6,5**
1800	97,1 ± 2,1	93,4 ± 1,1*, **
3600	93,6 ± 2,2	109,9 ± 5,5**
5400	93,8 ± 7,1	119,1 ± 7,4*, **
7200	100,7 ± 6,1	103,5 ± 8,6

* $p < 0,05$ при сравнении с контрольной группой (0 секунда);

** $p < 0,05$ при сравнении с миелокариоцитами старых крыс.

Внесение адреналина в инкубационную среду с миелокариоцитами приводило к увеличению КПОЛ в клетках зрелых и старых крыс. Максимальное увеличение КПОЛ у зрелых крыс наблюдалось на 5 секунде эксперимента (КПОЛ увеличился на 20% $p < 0,05$), а у старых крыс на 10 секунде (КПОЛ увеличился на 28% $p < 0,05$, по сравнению с контролем) (таблица 2). Такое возрастное различие, выраженное в более поздней активации КПОЛ у старых крыс, возможно, связано с возрастным снижением количества и аффинитета адренорецепторов миелокариоцитов.

Через некоторое время после увеличения КПОЛ, вызванного адреналином, в исследуемых миелокариоцитах крыс происходит уменьшение его величины. Максимальное уменьшение, как в клетках старых, так и зрелых крыс происходит одновременно на 180 секунде после добавления в инкубационную среду адреналина. Так, в миелокариоцитах зрелых крыс через 180 секунд после добавления адреналина уровень КПОЛ понизился на 18% ($p < 0,05$) по сравнению с максимумом на 5 секунде, у старых крыс уровень КПОЛ понизился на 32% ($p < 0,05$) по сравнению с максимумом на 10 секунде (таблица 2).

При сравнении данных по изменению КПОЛ в миелокариоцитах зрелых и старых крыс можно сделать вывод, что в клетках зрелых крыс уровень КПОЛ выше, чем в клетках старых крыс, но амплитуда изменения

КПОЛ, в свою очередь, больше в клетках старых крыс (таблица 2).

Выявленные различия между зрелыми и старыми крысами в изменении величины КПОЛ миелокардиоцитов под воздействием адреналина можно объяснить тем, что у старых крыс в клетках и межклеточной среде костного мозга может наблюдаться повышенное содержание липидов, слабовосприимчивых к ПОЛ. Это, в первую очередь, холестерин и насыщенные жирные кислоты, которые могут обладать структурными антиоксидантными свойствами, т.е. своим нахождением в месте возможной реализации ПОЛ препятствуют распространению свободных радикалов, не вступая в свободнорадикальные химические реакции. У старых крыс ферментативная антиокислительная система усиливается структурным антиоксидантным эффектом липидов, у зрелых крыс их меньше, и поэтому КПОЛ в миелокардиоцитах уменьшается не столь значительно, как у старых крыс.

Адреналин способствует увеличению КПОЛ в миелокардиоцитах крыс обоих возрастов, дальнейшие изменения процессов ПОЛ развиваются в соответствии с теми условиями, которые имеются в клетках. Причина увеличения интенсивности процессов ПОЛ при введении адреналина может заключаться в активации катаболических путей обмена веществ. Адреналин вызывает в клетке активацию гидролитических реакций с расщеплением макромолекул до их составляющих [7, 13], в частности триглицеридов и фосфолипидов до жирных кислот, которые являются основным субстратом процессов ПОЛ. Тем самым фоновый уровень ПОЛ, который присутствует в норме в каждой клетке, может увеличиваться (рис. 1).

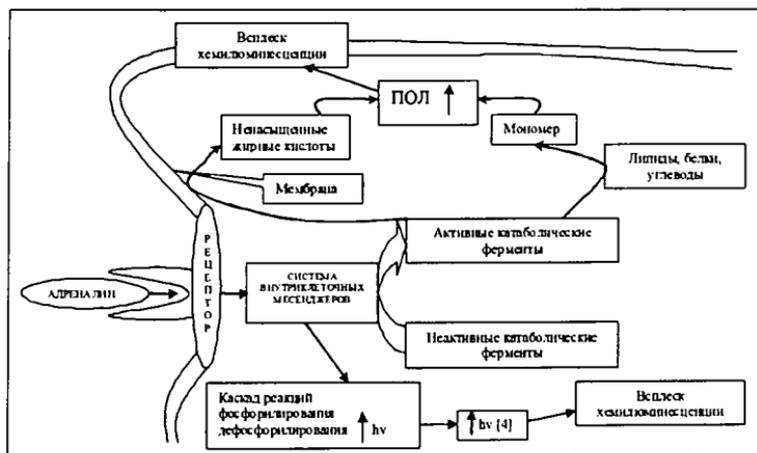


Рисунок 1. Схема возможного механизма приводящего к увеличению ПОЛ и хемилюминесценции при воздействии на миелокардиоциты адреналином *in vitro*.

При инкубации миелокарицитов с адреналином без индуцирования H_2O_2 было обнаружено спонтанное свечение или биолюминесценция с возможной активацией ПОЛ в этих клетках. Введение адреналина в инкубационную среду клеток в соотношении 4 молекулы нейромедиатора на 1 миелокариоцит приводило к увеличению свечения при хемиллюминесцентном анализе. Свечение, вызванное адреналином, в клетках старых крыс, особенно впервые секунды реакции, достоверно превышает аналогичное свечение клеток у зрелых крыс. Так, максимальное увеличение свечения у зрелых крыс наблюдалось на 17 секунде после введения адреналина, (свечение увеличилось в 6 раз, $p < 0,05$) у старых крыс на 11 секунде (свечение увеличилось в 12,5, $p < 0,05$) (рис. 2).



Рисунок 2. Сравнительная хемиллюминограмма (без индуцирования H_2O_2) миелокарицитов старых и зрелых крыс при инкубации с адреналином.

По нашему мнению, подобное увеличение свечения может быть вызвано, двумя причинами.

Первая причина — это свечение, связанное с активацией процессов ПОЛ в результате катаболического воздействия адреналина (рис. 2).

Вторая — это свечение, вызванное каскадом ферментативных биохимических реакций, запускаемых адреналином. Большинство этих реакций связано с распадом макроэргических связей (фосфорилирование). В ходе этих биохимических реакций может происходить выделение энергии в виде квантов света [6], которые и вызывают увеличение свечения при хемиллюминесцентном анализе (рис. 1).

Не исключено, что различная динамика активированной под действием адреналина хемиллюминесценции миелокарицитов у зрелых и старых крыс связана с разнонаправленным влиянием гормона на свободноради-

кальные процессы, реализуемые через α - и β -адренорецепторы. Так, установлено, что обработка макрофагов β -адреномиметиками приводит к ингибированию, а α -адреномиметиками — к стимуляции продукции активных форм кислорода [3]. Возможно, при старении организма изменяется чувствительность α - и β -адренорецепторов миелокариоцитов, что модулирует ответ культивируемых клеток на стимуляцию α , β -адреномиметиком адреналином.

Таким образом, в проведенном исследовании продемонстрированы возрастные особенности регуляции адреналином процессов ПОЛ в миелокариоцитах животных. По нашему мнению, исследование биолюминесценции может служить чувствительным тестом для выявления возрастных особенностей свободнорадикальных процессов в культивируемых клетках костного мозга. Полученные результаты могут стать основанием для рекомендации проводить антиоксидантную обработку стволовых клеток костномозгового происхождения при их трансплантации во избежание повреждения пересаживаемых клеток процессами ПОЛ.

Выводы.

1. В миелокариоцитах старых интактных крыс интенсивность ПОЛ ниже, чем у зрелых, что может быть связано с повышенным содержанием в миелокариоцитах старых крыс насыщенных липидов и холестерина.
2. Введение адреналина в инкубационную среду миелокариоцитов старых и зрелых крыс *in vitro* приводит к увеличению показателей КПОЛ. На протяжении данного эксперимента величина изменений КПОЛ была больше в миелокариоцитах зрелых крыс, но амплитуда изменений КПОЛ была больше в миелокариоцитах старых крыс.
3. Адреналин в миелокариоцитах зрелых и старых крыс вызывает увеличение спонтанной биолюминесценции, что может быть как следствием активации ПОЛ, так и результатом внутриклеточных реакции фосфорилирования белка вызванных действием адреналина. В миелокариоцитах старых крыс активация спонтанной люминесценции при введении адреналина была больше, чем в миелокариоцитах зрелых крыс, что, возможно, связано с возраст-зависимым изменением реактивности α - и β -адренорецепторов.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Анисимов В.Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения / В.Н. Анисимов. – СПб.: Наука, – 2008. – Т.1. – 281 с.
2. Анохина Е.Б. и др. Гетерогенность стромальных клеток-предшественников, выделенных из костного мозга крыс / Е.Б. Анохина, Л.Б. Булавкова // Цитология. – 2007. – Т.4, №1. – С. 41–47.
3. Бизунок Н.А. и др. Адренергическая регуляция клеточной продукции активных форм кислорода / Н.А. Бизунок, Б.В. Дубовик, А.В. Наджарян // Рецепт. – 2007. - № 1. – С. 34 – 38.
4. Владимиров Ю.А. и др. Свободные радикалы и клеточная хемилуминесценция / Ю.А. Владимиров, Е.В. Проскурина // Успехи биологической химии. – 2009. – Т.49. – 2009. – С. 341-388.

5. Жернова Е.В. и др. Протективный эффект кортексина в условиях индуцированного окислительного стресса и под влиянием этанола на модели лимфоцитов периферической крови здоровых лиц / Е.В Жернова, И.С Лосенков, Н.М Вялова, С.А.Иванова // Медицинские науки. - 2012.- №7. – С. 314-318.
6. Журавлев А.И. Спонтанная сверхслабая биохемилюминесценция - основа квантовой биологии / А.И. Журавлев // Успехи соврем. биологии. - 1991. - Т. 111, Вып. 1. - С. 144-153.
7. Коваленко Г.А. и др. Специфическая гидролитическая активность липопротеинов / Г.А. Коваленко, Е.Н. Антипова, Р.А. Князев // Бюллетень СО РАМН. – 2010. – Т. 30, №2. – С. 49-52.
8. Макарова Г.А. и др. Синдром перетренированности у спортсменов / Г. А. Макарова, С. Н. Волков, С. А. Локтев, Т. В. Бушуева // Спортивная медицина. - 2011. - №1-2. – С. 11-22.
9. Новиков Д.А. и др. Статистические методы в медико-биологическом эксперименте (типовые случаи) / Д.А. Новиков, В.В. Новочадов – Волгоград: ВолГМУ. – 2005. – 84 с.
10. Парин С.Б. и др. Психофизиологические и нейрохимические механизмы стресса и шока: эксперимент и модель / С.Б. Парин, В.Г. Яхно, А.В. Цверов, С.А. Полевая // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского.- 2007. - № 4. - С. 190–196.
11. Репин В.С. и др. Эмбриональные стволовые клетки: фундаментальная биология и медицина / В.С. Репин, А.А. Ржанинова, Д.А. Шаменков. – М., 2002. – 176 с.
12. Серкиз Я. И. и др. Хемилюминесценция крови в экспериментальной и клинической онкологии / Я. И. Серкиз, Е. Е. Чеботарев, В. А. Барабой – Киев: Наукова думка, 1984. - 184 с.
13. Хидирова Л.Д. Изменение баланса между активностью перекисного окисления липидов, антиокислительной защитой и содержанием железа у крыс при экспериментальном инфаркте миокарда // Региональная фармакотерапия в кардиологии. – 2010. - №6(2) – С. 216-219.
14. Чукаева С.А. и др. Перекисное окисление липидов тканей экспериментальных животных при действии нормобарической гипоксии / С.А. Чукаева, А.Г. Бельих, В.М. Гукасов // Теоретические экспериментальные и прикладные исследования биологических систем: Респ. сб. науч. тр. Под ред. Романова Ю.А. – М., 1991. – С. 125-128.
15. Ястребов А.П. и др. Старение, перекисное окисление липидов и биовозраст / А.П. Ястребов, В.Н. Мещанинов - Екатеринбург: Уральский следопыт. – 2005. – 217 с.
16. Giudice A. et al. Circadian rhythms, adrenergic hormones and trafficking of hematopoietic stem cells. / A. Giudice, M. Caraglia, M. Marra, M. Montella, N. Maurea, A. Abbruzzese, C. Arra. Expert Opin. Ther. Targets. – 2010. – V.14, № 5. – P. 567 - 575.
17. Scheiermann C. et al. Adrenergic nerves govern circadian leukocyte recruitment to tissues / C. Scheiermann, Y. Kunisaki, D. Lucas, A. Chow, J.E. Jang, D. Zhang, D. Hashimoto, M. Merad, P.S. Frenette // Immunity. – 2012. – V.37, №2. – P. 290 - 301.