

Among the major factors influencing health of the person, the oxygen maintenance in atmospheric air takes a leading

place. Considering it, research of influence of a hypoxemia on adaptive possibilities of an organism in whole and its separate systems, in particular, blood is of interest.

## ПРИМЕНЕНИЕ БЕЛОГО ШЛАМА В КАЧЕСТВЕ РЕГУЛЯТОРА ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА НА МОДЕЛИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Ошурков П.А., Буханцев В.А., Филимонова П.А.

*Лаборатория молекулярных медицинских технологий Средне-Уральского научного центра РАН и Правительства Свердловской области*

*ГОУ ВПО УГМА Минздрава России  
Кафедра медицинской биологии и генетики*

*Контактный e-mail: oshurkov.p@gmail.com*

Достаточно давно известен эффект белого шлама (БШ), представляющего собой алюминатные разновидности сода-литоподобных гидроалюмосиликатов натрия, выявленный у животных, который состоит в увеличении массы тела и молокоотдачи при применении его в рационе крупного рогатого скота [2]. В то же время механизм данного феномена оставался не известным.

Определение механизмов влияния БШ на организм сельскохозяйственных животных потребовал всестороннего изучения основных проявлений его действия, что позволило очертить главные подходы к изучению механизмов действия БШ.

Однонаправленный эффект БШ как у крупного рогатого скота (КРС), так и у птицы, а также наличие сведений об увеличении привесов и продукции молока, реализуемых через разные регуляторные системы, свидетельствует о видовой неспецифичности и отсутствии тканевой селективности минеральной подкормки. Кроме того, прямой воспроизводимый эффект БШ достигается на уровне целого организма (*in vivo*), но не подтверждается *in vitro*, то есть реализуется на системном и межсистемном уровнях организации биосистем.

Состав БШ, включающий только минеральные компоненты, позволяет исключить их прямое участие в качестве элемента нейрогуморальной регуляторной системы. Химическая структура БШ не позволяет отнести его и к энергетическим субстратам, в процессе окисления которых образуются макроэргические связи. В то же время, высокая специфичность и энергозависимость субстрат-транспортных систем не дает оснований предполагать их прямое замещение и/или дополнение компонентами БШ.

Увеличение веса животных не может быть объяснено исключительно нейтрализацией негативных факторов окружающей среды. Так, влияние тяжелых металлов, в отношении падения массы тела, до сих пор не подтверждено. В свою очередь, активация БШ иммунной системы и следующее за этим увеличение массы так же находится под большим вопросом. В любом случае нейтрализация негативных факторов (техногенных поллютантов или низкой активности иммунной системы) если и даст увеличение выживаемости животных, то не позволит интерпретировать резкое увеличение массы тела.

Таким образом, известные эффекты белого шлама, используемого в качестве подкормки животных, входят в противоречие с данными о химическом составе и свойствах БШ – с одной стороны и параметрами его действия – с другой.

Наш интерес был ограничен исключительно механизмом клеточного действия БШ, что позволило сформулировать следующие цель и задачи работы.

**Цель исследования** – изучение клеточного метаболизма в условиях применения белого шлама в качестве добавки в рацион сельскохозяйственных животных

### **Задачи работы:**

1. Оценить влияние БШ на синтез макромолекул – ДНК, РНК и белка.

2. Исследовать проницаемость клеточных мембран для пластических и энергетических субстратов.

Для определения подходов к выполнению этой работы мы учитывали, что эффект БШ реализуется на уровне целого организма и до сих пор не известно, влияют ли компоненты БШ как самостоятельно, так и в виде метаболитов. Поэтому стартовая рабочая гипотеза состояла в том, что под влиянием БШ образуются вещества, поступающие в тканевые жидкости и, в первую очередь, в кровь. Эта гипотетическая субстанция обладает способностью видонеспецифически активировать различные клетки, что проявляется увеличением в них анаболических процессов и/или торможением процессов катаболизма.

### **Материалы и методы исследования**

Оценка синтетической активности кровяной ткани и проницаемости клеточной мембраны проводилась на культуре стромальных механоцитов (костномозговых фибробластов) костного мозга КРС, выделенных на основании признака адгезии к пластику, с использованием радиофармпрепаратов производства Amersham Biosciences (UK).

Включение радиоактивных препаратов *in vitro* обосновывается тем, что клетки, выделенные из организма и помещенные в питательные среды, сохраняют основные характеристики пролиферативных процессов, полученные на организменном уровне. Вместе с тем, сохраняется возможность проводить исследования синтетической активности в зависимости от прямого воздействия внешних факторов в период инкубации культуры с радиофармпрепаратом.

В качестве модели использовалась культура кровяных клеток телят. Костный мозг из костей выделяли по стандартной методике [1]. Полученную культуру клеток инкубировали в среде RPMI 1640, в присутствии меченых предшественников синтеза макромолекул, при 37° С, в течение 40 минут.

Анализ результатов по включению меченых предшественников в клетку существенно затруднен без учета состояния проницаемости клеточной мембраны для радионуклидов. Методические основы такой оценки разработаны Эйдуком Л.Х. [5], который обосновывает необходимость определения включения радионуклида как в макромолекулы, так и в клетки в целом.

Исходя из этого, производился подсчет радиоактивности в клетке путем простого осаждения клеток на фильтрах (Millipore, США) с последующей отмывкой и радиометрией в простом толловом сцинтилляторе. Это позволяет дать

количественную характеристику вошедшего в клетки радионуклида и оценить состояние проницаемости клеточной мембраны для него. Для подсчета включения метки в макромолекулы, клетки предварительно лизировали 5% раствором трихлоруксусной кислоты и затем осаждали на фильтрах, отмывали и радиометрировали. При этом определялся процент включения радионуклида в макромолекулы к прошедшему в клетки. Этот показатель достоверно характеризует степень утилизации радионуклида, прошедшего через мембрану.

Метод радиометрии, использованный в работе, изложен в исследованиях Тацневского В.А. [4] и Остермана Л.А. [3].

Для подсчета радиоактивности использовали жидкостный сцинтилляционный счетчик "Бета-2". Высокая эффективность достигалась использованием сцинтилляционных жидкостей: простого толуолового сцинтиллятора для радиометрии фильтров и спирто-толуолового сцинтиллятора для радиометрии водных растворов.

Радиоактивность выражали в беккерелях (Бк):

радиоактивность, Бк = (СРМ опытного флакона - СРМ фонового)/эффективность счета.

Статистическая обработка полученных материалов проводилась с использованием пакета прикладных программ «Microsoft Excel 2004 for Macintosh».

### Результаты исследования и их обсуждение

Бесспорным проявлением действия БШ является увеличение клеточной массы, что предусматривает активацию синтеза нуклеиновых кислот и белка.

Оценка интенсивности синтеза производилась по включению специфических маркеров синтеза макромолекул: в ДНК специфического меченого предшественника -  $^3\text{H}$ -тимидина, а в РНК -  $^3\text{H}$ -уридина.

Изучение синтеза белка выполнялось с использованием общемеченой аминокислоты  $\text{H}^{14}$ -глицина и  $^3\text{H}$ -лейцина - аминокислот, участвующих в построении первичной структуры всех белков.

Исследование выполнялось на культуре стромальных мезанефротических клеток мозга, которые инкубировались с плазмой животных, получавших БШ (опыт), или интактных животных (контроль).

Оказалось, что полуторачасовая инкубация фибробластов с плазмой животных, получавших БШ в течение 72 суток, сопровождалась достоверным увеличением включения в белок меченных глицина и лейцина. При этом значимых изменений синтеза ДНК по включению меченого тимидина и уридина в РНК не было зарегистрировано (Табл. 1).

Таблица 1

Включение меченных предшественников в ДНК, РНК и белок (в Бк/10<sup>6</sup> клеток)

Радионуклиды	Включение под влиянием плазмы интактных животных	Включение под влиянием плазмы животных, получавших БШ
$^3\text{H}$ -тимидин	71,4±4,2	73,3±6,4
$^3\text{H}$ -уридин	58,7±6,5	57,0±3,4
$\text{U}^{14}$ -глицин	16,6±0,3	47,8±0,9 *
$^3\text{H}$ -лейцин	16,0±1,5	29,0±0,5 *

\* - здесь и далее различия достоверны (p<0,05)

Селективная активация включения аминокислот в белки позволяет предполагать, что в плазме животных, получавших БШ, присутствует вещество, активирующее их синтез, что обычно сопровождается делением клеток, а их гипертрофию. В этом случае, с учетом преобладания процессов гипертрофии, должно наблюдаться возрастание проницаемости клеточных мембран для различных субстратов. В качестве маркеров проницаемости были использованы меченные изотопами: тимидин, уридин, глицин, лейцин,

янтарная кислота, арахидоновая кислота, глутаминовая кислота, глюкоза и этиловый спирт.

Под влиянием плазмы животных, получавших БШ, достоверно возрастает включение в целые клетки меченых тимидина, уридина, глицина, янтарной и глутаминовой кислот, этилового спирта, но не арахидоновой кислоты и глюкозы (Табл. 2). В отношении последних регистрируется некоторое снижение проницаемости. Дополнительная серия экспериментов с использованием разведенной плазмы подтвердила, что зарегистрированный феномен не случаен.

Таблица 2

Включение меченых предшественников в клетки (в Бк/10<sup>6</sup> клеток)

Радионуклиды	Включение под влиянием плазмы интактных животных	Включение под влиянием плазмы животных, получавших БШ
$^3\text{H}$ -тимидин	247,0±9,5	298,1±12,3*
$^3\text{H}$ -уридин	214,8±8,2	319,6±46,4*
$\text{U}^{14}$ -глицин	30,6±4,3	66,6±1,8*
$^3\text{H}$ -лейцин	27,8±6,1	46,38±3,7*
$^3\text{H}$ -янтарная кислота	180,4±8,1	229,3±18,9*
$^3\text{H}$ -арахидоновая кислота	58,7±5,6	52,2±2,8*
$^3\text{H}$ -глутаминовая кислота	170,6±10,6	340,9±13,0*
$^3\text{H}$ -глюкоза	54,5±11,1	44,3±6,2*
$^3\text{H}$ -этиловый спирт	58,3±7,8	80,6±11,0*

Проницаемость клеточных мембран для предшественников синтеза нуклеиновых кислот, глицина и лейцина позволила сопоставить их накопление в клетках с параметрами синтеза макромолекул. Выяснилось, что доля меченых тимидина и уридина, включающихся в макромолекулы, к их общему количеству, прошедшему через мембраны (коэффициент утилизации субстрата), несколько ниже под действием плазмы животных, получавших БШ, чем при использовании плазмы контрольных животных (Табл. 3). Это ука-

зывает на то, что накопление пластических субстратов в клетках не влечет за собой их включение в нуклеиновые кислоты, подтверждая гипотезу об активации процессов, ведущих к клеточной гипертрофии.

Одновременно как проницаемость, так и коэффициент утилизации глицина остаются достаточно высокими, указывающими на стимуляцию белкового синтеза. Параметры включения незаменимой аминокислоты лейцина направлены с глицином, но количественно менее выражены.

Коэффициенты утилизации субстратов (включение в макромолекулы/включение в клетки x 100%)

Радионуклиды	Коэффициенты под влиянием плазмы интактных животных	Коэффициенты под влиянием плазмы животных, получавших БШ
<sup>3</sup> H-тимидин	28,88	24,59
<sup>3</sup> H-уридин	27,33	17,84
<sup>14</sup> C-глицин	54,19	71,83
<sup>3</sup> H-лейцин	57,64	62,53

В свою очередь, увеличение проницаемости клеточных мембран под влиянием плазмы животных, получавших БШ, для субстратов окисления, таких как янтарная и глутаминовая кислоты, этиловый спирт согласуется с представлениями об активации гипертрофических процессов. В то же время, следует признать, что с одной стороны, некоторое снижение проницаемости мембран для жирных кислот и глюкозы не вписывается в общепринятые представления о клеточной гипертрофии, а с другой, эти результаты свидетельствуют о возможной активации процессов клеточного липолиза и увеличении резистентности к глюкозе.

Все вышесказанное дает основание предполагать, что на фоне основных признаков, характеризующих гипертрофию, проявляется присутствие дополнительного регуляторного звена, отличающего БШ-обусловленные процессы.

#### Выводы

1. Использование минеральной подкормки БШ в рационе сельскохозяйственных животных приводит к селективной активации белок-синтезирующего аппарата клетки, что в свою очередь сопровождается преобладанием гипертрофии над процессом клеточного деления.

2. Наблюдаемое повышение проницаемости клеточных мембран для пластических и энергетических субстратов, а также снижение коэффициента утилизации предшественников синтеза нуклеиновых кислот, под действием плазмы животных, получавших БШ, свидетельствует об активации процессов, ведущих к гипертрофии клеток.

3. Снижение проницаемости мембран для глюкозы и жирных кислот, свидетельствующее об увеличении толерантности клеток к глюкозе и возможной активации про-

цессов липолиза, приводит к необходимости поиска дополнительного регуляторного звена БШ-обусловленных процессов.

#### Литература

1. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Шахов В.П. Методы культуры тканей в гематологии. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 1992 – 264 с.
2. Котомцев В.В., Бураев М.Э. Биозлементы в рационе крупного рогатого скота. / В.В. Котомцев, М.Э. Бураев, Ф.М. Сбродов, О.В. Ильичева. // Под. ред. В.В. Котомцева. - Екатеринбург: Изд-во УрГСХА, 2004. – 216 с.
3. Остерман Л.А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами. // М.: Наука, 1983. - 304 с.
4. Тащевский В.А. Измерение радиоактивности биологических образцов с помощью жидких сцинтилляторов. // Мед. радиол. - 1977. - № 7. - С. 81-89.
5. Эйбус Л.Х. Неспецифическая реакция клеток и радиочувствительность. – М.: Атомиздат, 1977. – С. 56-67.

#### USE OF WHITE SLIME AS A REGULATOR OF INTRACELLULAR METABOLISM ON THE MODEL OF CATTLE

P.A. Oshurkov, V.A. Buhantsev, P.A. Filimonova

The article investigates the possibility of using white sludge as a regulator of intracellular metabolism in the model of cattle.

#### РЕДОКС-СТАТУС И АПОПТОЗ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

Папина С.Б.

ФГОУ ВПО Южный Федеральный университет  
Кафедра биохимии и микробиологии  
Россия, г. Ростов-на-Дону

Контактный e-mail: [tailana@donnetwork.ru](mailto:tailana@donnetwork.ru)

Оксидативный стресс и нейродегенерация часто связаны с нервными заболеваниями, такими, как болезнь Паркинсона (БП). С другой стороны, имеются данные, согласно которым лимфоциты могут вступать в непосредственные контакты с нейронами и, обладая соответствующим рецепторным аппаратом, могут воспринимать нейрорегуляторные влияния [2]. Таким образом, нейроны и лимфоциты открыты одним из тем же видам сигнальных молекул [1].

#### Материалы и методы исследования

Материалом для исследований служили лимфоциты, плазма крови и эритроциты 10 пациентов в возрасте 50-65 лет с диагнозом БП. Также была исследована контрольная группа в количестве 12 человек той же возрастной категории. Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) определяли по содержанию ТБК-положительных продуктов в пересчете на малоновый диальдегид (МДА) [6]. Активность супероксиддисмутазы оценивали по ее способности

ингибировать восстановление нитротетразолиевого синего при генерации супероксидного анион-радикала [5]. Активность каталазы оценивали по ее способности разлагать перекись водорода, которая образует окрашенный комплекс с молибдатом аммония с максимумом поглощения при 410 нм [3]. Активность глутатионпероксидазы определяли по скорости восстановления глутатиона гидроперекиси третичного бутила [4]. Уровень апоптоза лимфоцитов оценивали методом проточной лазерной цитофлуориметрии [7].

#### Результаты и их обсуждение

В результате проведенного исследования установлено, что у пациентов с БП наблюдается накопление промежуточного молекулярного продукта перекисидации липидов – МДА, увеличение содержания которого в плазме крови и эритроцитах составляет 16% и 60%, соответственно. Активность СОД в лимфоцитах у пациентов с БП резко возрастает, на 90% по сравнению с контролем. Активность каталазы