

3. Колесников, Л. Л. Сфинктерный аппарат человека / Л. Л. Колесников. — СПб.: СпецЛит, 2000. — 183 с.

4. Юпатов, С. И. Строение мускулатуры конечного отдела общего желчного протока / С. И. Юпатов // Актуальные вопросы хирургии желчных путей: сб. тр. Всерос. науч. мед. общества хирургов, 1968. — С. 212–214.

5. Artur, W. Ham. Histology: Eighth Edition. / W. Ham. Artur, H. Cormac. David // J. B. Lippincott Company, Philadelphia and Toronto, 1989. — 966 p.

6. Oddi, R. D'une disposition a sphincter speciale de l'ouverture du canal choledoque. / R. Oddi // Archives italiennes de biologie revus, resumes, reproductions des travaux scientifiques italiens sous la direction de A. Mosso. — Turin, Sixieme annee, 1887. — T. 8. — P. 317–322.

Поступила 21.11.2007

УДК 616.411- 006.443:612.26

## ХАРАКТЕРИСТИКА МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ СЕЛЕЗЕНКИ КРЫС

А. Абдулкадер

Гомельский государственный медицинский университет

В работе дана характеристика митохондриального окисления кусочков селезенки интактных белых крыс. Показана высокая дыхательная активность этого важного иммунокомпетентного органа, которая обусловлена выполнением селезенкой множества гомеостатических функций.

**Ключевые слова:** митохондриальное окисление, селезенка, белые крысы.

## THE CHARACTERISTIC MITOCHONDRIAL OXIDATIONS OF A SPLEEN OF RATS

A. Abdulkader

Gomel state medical university

In the paper presents the characteristic of mitochondrial oxidation of spleen slices of intact albino rats. High respiratory activity of this important immune-competent organ caused by the number of homeostatic functions performed by the spleen is shown.

**Key words:** mitochondrial oxidation, spleen, albino rats.

### Введение

Селезенка, как и вся лимфоидная ткань отличается исключительно высокой функциональной активностью [3, 6], которая требует адекватного энергетического сопровождения. Это подтверждается представлением о том, что митохондриальная дисфункция иммунокомпетентных органов ассоциируется с развитием возрастной и индуцированной иммуносупрессии [19, 22].

Имеется ряд косвенных данных, свидетельствующих, что в селезенке имеется весьма высокий уровень митохондриального окисления — основного продуцента биологически конвертируемой энергии аэробных тканей. Вместе с тем прямых свидетельств, характеризующих параметры тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования (ТД и ОФ) интактной селезенки, в доступной литературе мы не обнаружили.

Селезенка как интенсивно функционирующий иммунокомпетентный орган [7, 9] давно привлекает внимание исследователей, и первые пионерские работы по характеристике дыхания изолированных митохондрий (Мх) и гомогенатов селезенки начали проводиться манометрическим методом более полувека тому назад [11, 20, 21, 24, 25].

Однако отметим, что манометрический метод изучения тканевого дыхания и ОФ, предложенный О. Варбургом, имеет ряд принципиаль-

ных недостатков, искажающих истинную метаболическую картину изучаемых тканей, тканевых препаратов и изолированных органелл. Это обусловлено его относительно малой точностью и чувствительностью, инерционностью, громоздкой технической частью, трудоемкостью и длительностью процедуры определения, отсутствием возможности вести непрерывное кинетическое наблюдение в условиях моделирования физиологических нагрузок и т.д. [4].

Разработка и внедрение в исследовательскую практику полярографического метода — «золотого стандарта» биоэнергетики позволила преодолеть указанные недостатки манометрического метода. Полярографический метод точен и высокочувствителен, малоинерционен, позволяет вести кинетические наблюдения за короткое время при моделировании функциональных нагрузок и использовании специфических ингибиторов, в условиях, наиболее приближенных к физиологическим [4]. Указанные преимущества весьма важны для оценки метаболического состояния тканей организма, подвергнутых действию факторов малой и сверхмалой интенсивности, к каковым относится, например, низкодозовое ионизирующее излучение [1, 2].

Принимая во внимание вышеуказанное, а также оценивая эти результаты с современных позиций, необходимо подчеркнуть, что использо-

вание изолированных Мх существенно ограничивает возможность аппроксимации полученных результатов к условиям *in vivo* целого органа и организма [18].

Тщательный анализ доступной литературы показал отсутствие работ, посвященных изучению параметров ТД и ОФ интактной селезенки, проведенных полярографическим методом.

В связи с этим, **целью исследования** явилось детальное изучение полярографическим методом параметров ТД и ОФ кусочков селезенки интактных животных.

#### Материалы и методы

Исследования проводились на белых крысах-самцах массой 200–230 г. При этом соблюдались все требования Хельсинкской Декларации по гуманному обращению с животными (1975, пересмотр. 1993), Директивы Совета Европейского Сообщества по защите животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (1986), и других нормативных актов, принятых в международной практике лабораторного животноводства.

Все экспериментальные животные содержались на стандартном рационе вивария. После забоя животных путем декапитации извлеченную селезенку отмывали от крови физиологическим раствором, охлаждали в растворе Хэнкса и продавливали через плунжер, имеющий отверстия диаметром 0,5 мм. В полученных таким образом тканевых препаратах изучали показатели ТД и ОФ на полярографе ПЛС-1 (РБ) в ячейке объемом 2 мл закрытым платиновым электродом Кларка при температуре 30°C в растворе Хэнкса.

Определяли скорость дыхания на эндогенных субстратах ( $V_{\text{энд}}$ ) при добавлении 5 мМ сукцината ( $V_{\text{як}}$ ), 5 мМ глутамата ( $V_{\text{глу}}$ ) и разобщи-

теля ОФ — 100 мкМ 2,4-динитрофенола ( $V_{\text{днф}}$ ). Скорость поглощения кислорода тканью выражали в нМ кислорода за 1 мин на мг белка исследуемого тканевого препарата. Количество белка определяли биуретовым методом.

Наряду с этим рассчитывали величину стимулирующего действия янтарной кислоты  $СД_{\text{як}} = V_{\text{як}}/V_{\text{энд}}$ , глутамата  $СД_{\text{глу}} = V_{\text{глу}}/V_{\text{энд}}$  и 2,4-динитрофенола  $СД_{\text{днф}} = V_{\text{днф}}/V_{\text{глу}}$ . Перечисленные выше параметры ТД и ОФ позволяют достаточно полно охарактеризовать состояние энергетического обмена ткани [1, 6].

#### Результаты и обсуждение

Исследования показали, что кусочки селезенки обладают уровнем митохондриальной дыхательной активности, которая по абсолютным величинам сопоставима с таковой у миокарда [1]. Высокий уровень дыхательной активности кусочков селезенки проявляется не только при дыхании препаратов на эндогенных субстратах ( $V_{\text{энд}}$ ), но и при использовании экзогенного сукцината ( $V_{\text{як}}$ ) и глутамата ( $V_{\text{глу}}$ ) (таблица 1).

Высокую дыхательную активность ткани селезенки можно объяснить ее интенсивным кровоснабжением и большой концентрацией в ней лимфоцитов, обладающих, как известно, высоким уровнем аэробного энергетического метаболизма [7, 10].

Параметры митохондриального дыхания, полученные полярографическим методом, дают возможность оценить степень интактности изучаемого объекта [18], поскольку они адекватно характеризуют проницаемость различных мембран клетки, которые обычно повреждаются в процессе работы с тканью на этапе получения фрагмента ткани, тканевого препарата или изолированных органелл.

Таблица 1 — Показатели тканевого дыхания интактной селезенки в эндогенных и экзогенных субстратах

Показатели	$V_{\text{энд}}$	$V_{\text{як}}$	$СД_{\text{як}}$	$V_{\text{глу}}$	$СД_{\text{глу}}$
Контроль	4,37±0,22	5,70±0,19	1,42±0,06	4,81±0,29	1,24±0,04

Особенно информативны в этом отношении как абсолютные скорости дыхания на «аварийном» субстрате — янтарной кислоте ( $V_{\text{як}}$ ) (таблица 1), так и относительные показатели — коэффициент стимулирующего действия этого субстрата ( $СД_{\text{як}}$ ) (таблица 2). Оценивая степень интактности кусочков селезенки контрольных животных с этих позиций, необходимо отметить, что изучаемые тканевые объекты отличались очень малой степенью повреждения, а используемый полярографический метод исследования параметров ТД и ОФ вполне адекватен. В пользу этого свидетельствует относительно небольшая разница

скоростей дыхания препарата как на эндогенных ( $V_{\text{энд}}$  составляет 4,37±0,22 нМ  $O_2$  /мин/мг белка), так и на экзогенных субстратах ( $V_{\text{як}}$  и  $V_{\text{глу}}$ ), составляющая, соответственно, 5,70±0,19 нМ  $O_2$  /мин/мг белка и 4,81±0,29 нМ  $O_2$  /мин/мг белка.

Весьма ценным и информативным показателем является и коэффициент стимулирующего действия экзогенных субстратов митохондриального окисления. Так, если скорость дыхания кусочков селезенки в присутствии сукцината возрастает всего лишь на 42%, то введенный в инкубационную среду глутамат стимулирует скорость дыхания на 24% (соответ-

венно показатели  $СД_{як}$  и  $СД_{глу}$  равны  $1,42 \pm 0,06$  и  $1,24 \pm 0,04$ ). Это, согласно сложившимся в биоэнергетике представлениям, характеризует высокую степень интактности изучаемого объекта.

Чрезвычайно важным и информативным показателем митохондриального окисления ткани является состояние системы сопряжения ТД и ОФ. Этот параметр мы оценивали методом ингибиторного анализа, используя классический разобщитель ТД и ОФ — 2,4 ДНФ. Скорость дыхания ткани, тканевого препарата или

изолированных Мх в присутствии этого разобщителя, а также показатель его стимулирующего действия ( $СД_{днф}$ ) позволяет оценить систему сопряжения ТД и ОФ, а значит, и степень интактности изучаемого объекта.

Данные таблицы 2 подтверждают, что изучаемые фрагменты ткани селезенки контрольных животных отличаются высокой степенью интактности, поскольку разобщитель 2.4-ДНФ стимулирует дыхательную активность ткани на 20% (коэффициент  $СД_{днф}$  составляет  $1,20 \pm 0,03$ ).

Таблица 2 — Показатели степени сопряжения ТД и ОФ селезенки контрольных животных

Показатели	$V_{энд}$	$V_{днф}$	$СД_{днф}$
Контроль	$4,37 \pm 0,22$	$7,19 \pm 0,83^{**}$	$1,20 \pm 0,03$

Примечание: \*\* —  $p < 0,01$  по сравнению с контролем

Исходя из вышеизложенного, есть все основания считать, что изучаемые кусочки ткани селезенки контрольных животных отличаются минимальным повреждением и высокой степенью интактности, а полученные результаты объективно отражают состояние ТД и ОФ селезенки контрольных животных. Полученные результаты соответствуют имеющимся в литературе представлениям об активной дыхательной функции ткани селезенки крыс, которая поддерживается высокой концентрацией в ней компонентов митохондриальной ДЦ — коэнзимов  $Q_9$ ,  $Q_{10}$  и витамина Е [17]. Об этом же свидетельствует высокий уровень коэффициента  $Q_{O_2}$  (отношение объема кислорода в микролитрах при стандартном давлении и температуре к весу ткани в мг), равный 12 [7], а также  $Ca^{2+}$ -зависимой стимуляции дыхательной и других функций спленоцитов и лимфоцитов, выделенных из селезенки [14], поскольку известно, что клетки, обладающие эффективной системой транспорта ионов  $Ca^{2+}$ , а также высокой чувствительностью к  $Ca^{2+}$  стимулам отличаются высокой активностью ТД и ОФ. Последнее связано с тем, что Мх являются центральной органеллой регуляции ионного, в том числе калиевого и кальциевого гомеостаза клетки [23].

Особая роль селезенки в поддержании различных гомеостатических, в том числе иммунологических функций организма обеспечивается рядом преимуществ, возникающих в процессе субстратного обеспечения ее митохондриального окисления. И это не только высокая концентрация в ней важнейших компонентов митохондриальной дыхательной цепи — коэнзимов  $Q_9$  и  $Q_{10}$  и витамина Е, обладающего выраженной антиоксидантной активностью, но и исключительная «конкурентоспособность» се-

лезенки за обладание указанными предшественниками ДЦ и антиоксидантами [17] и, возможно, экзогенными перорально вводимыми субстратами. Об этом свидетельствуют данные, согласно которым обогащение диеты коэнзимом  $Q_{10}$ ,  $Q_9$  и витамином Е приводит к избирательному накоплению этих соединений в ткани и особенно в Мх селезенки и печени, но не других органов [17].

Высокая скорость митохондриального окисления селезенки находится в хорошем соответствии с обнаружением в ней белка-разобщителя 3 (UCP3), наличие которого до настоящего времени связывали только с интенсивно дышащими тканями — скелетной мускулатурой и бурой жировой тканью. Функциональная активность и содержание этого белка в Мх селезенки резко возрастает при голодании, разобщении ОФ, окислительном стрессе, утилизации жирных кислот и других состояниях [12].

Кроме того, в Мх селезенки обнаружен самый высокий уровень экспрессии разобщающего белка — UCP2, функциональная активность которого в селезенке имеет ряд особенностей. Так, например, ретиноевая кислота и супероксид во многих тканях активируют обусловленный UCP2 протонный транспорт. Мх селезенки, по сравнению с Мх печени, обладают более высокой чувствительностью к разобщающему действию ретиноевой кислоты, однако это действие не связано с активностью UCP2. Супероксид не стимулирует разобщающую активность UCP2 Мх селезенки и не увеличивает тем самым протонную утечку. Наконец, в селезенке мышей, лишенных методом гомологичной рекомбинации гена белка-разобщителя (UCP2), не обнаружено увеличения отношения АТФ/АДФ [13]. Имеется ряд свидетельств, позволяющих сомневаться в том, что именно UCP2 в Мх се-

лезенки обладает разобщающей активностью. Вполне вероятно, что в селезенке он имеет другое физиологическое значение, а именно: взаимодействие пероксидов с UCP2 и другими белками-разобщителями *in vivo* может уменьшать концентрацию активных форм кислорода в Мх, предотвращая спленциты от окислительного повреждения и возможной гибели путем апоптоза [15, 16].

#### Заключение

Таким образом, проведенные полярографическим методом исследования по изучению активности митохондриального окисления куточков интактной селезенки, свидетельствуют о высоком уровне ТД и ОФ этого иммунокомпетентного органа, что обусловлено его многочисленными и исключительно важными энергозависимыми гомеостатическими функциями.

#### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Влияние инкорпорированных радионуклидов цезия на ультраструктуру и процессы тканевого дыхания митохондрий кардиомиоцитов / А. И. Грицук [и др.] // Весці НАНБ. Сер. мед. біял. навук. — 2002. — № 2. — С. 63–70.
2. Грицук, А. И. Тканевое дыхание печени крыс при облучении в сверхмалых дозах инкорпорированными радионуклидами цезия / А. И. Грицук, С. М. Сергеевко, А. Н. Коваль // Авиакосмическая и экол. медицина. — 2002. — № 5. — С. 60–62.
3. Кашкин, К. П. Иммунная система: морфо-функциональная организация периферических лимфоидных органов / К. П. Кашкин // Медицинская иммунология. — 1999. — Т. 1, № 1–2. — С. 11–16.
4. Кондрашова, М. Н. Принципиальные преимущества полярографического изучения дыхания перед манометрическим / М. Н. Кондрашова // Сб. руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом. — М.: Наука, 1973. — С. 86–93.
5. Кочетков, Г. А. Практическое руководство по энзимологии / Г. А. Кочетков. — М., 1980. — 220 с.
6. Иммунофизиология / В. А. Черешнев [и др.]. — Екатеринбург, 2002. — 260 с.
7. Уайт, А. Основы биохимии / А. Уайт [и др.]. — М.: Мир, 1981. — Т. 1.
8. Федоров, Н. А. Нормальное кроветворение / Н. А. Федоров. — М.: Медицина, 1975. — 623 с.
9. Шапкин, Ю. Г. Иммунный статус в отдаленном периоде пациентов, оперированных по поводу повреждения селезенки / Ю. Г. Шапкин, В. Ю. Киричук, В. В. Масляков // Хирургия журнал им. Н. И. Пирогова. — 2006. — № 2. — С. 14–17.
10. Ястребов, А. П. Влияние острой гипоксии на показатели энергетического метаболизма лимфоидных клеток / А. П. Ястребов, Н. К. Сегаль // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. — 1978. — № 2. — С. 65–67.
11. Benjamin, T. L. The mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation in rat spleen and liver mitochondria after whole-body irradiation / T. L. Benjamin, H. T. Yost // Rad. Res. — 1960. — Vol. 12. — P. 613–625.
12. Carroll, A. M. Starvation-sensitive expression in thymus and spleen mitochondria / A. M. Carroll, R. K. Porter // Biochim. Biophys. Acta. — 2004. — Vol. 1700, № 2. — P. 145–150.
13. No evidence for a basal, retinoic, or superoxide-induced uncoupling activity of the uncoupling protein 2 present in spleen or lung mitochondria / E. Couplan [et al.] // J. Biol. Chem. — 2002. — Vol. 27, № 29. — P. 26268–26275.
14. Role of mitochondria in the immune response to cancer: a central role for Ca<sup>2+</sup> / G. R. Degasperi [et al.] // J. Bioenerg Biomembr. — 2006. — Vol. 38, № 1–3. — P. 1–10.
15. Echtaý, K. S. Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins / K. S. Echtaý [et al.] // Nature. — 2002. — Vol. 415, № 6867. — P. 96–99.
16. Erlanson-Albertsson, C. The role of uncoupling proteins in the regulation of metabolism / C. Erlanson-Albertsson // Acta Physiol Scand. — 2003. — Vol. 178, № 4. — P. 405–412.
17. Dietary coenzyme Q10 and vitamin E alter the status of these compounds in rat tissues and mitochondria / W. H. Ibrahim [et al.] // J. Nutr. — 2000. — Vol. 130, № 9. — P. 2343–2348.
18. Preparations of native properties in rat liver homogenate / M. N. Kondroshova [et al.] // Mitochondrion. — 2001. — Vol. 1. — P. 249–267.
19. Mather, M. Aging enhances the activation of the permeability transition pore in mitochondria / M. Mather, H. Rottenberg // Biochem Biophys Res Commun. — 2000. — Vol. 273, № 2. — P. 603–608.
20. Maxwell, It. E. Effect of X-irradiation on phosphorus metabolism in spleen mitochondria / It. E. Maxwell, G. Ashwell // Arch. Biochem. Biophys. — 1953. — Vol. 43. — P. 389–398.
21. Potter, L. Oxidative phosphorylation in spleen mitochondria / L. Potter, F. H. Bethell // Fed. Proc. — 1952. — Vol. 11. — P. 270–277.
22. Rottenberg, H. Mitochondrial dysfunction in lymphocytes from old mice: enhanced activation of the permeability transition / H. Rottenberg // Res. Commun. — 1997. — Vol. 240, № 1. — P. 68–74.
23. Roux, B. Ion conductive and selectivity in K<sup>+</sup> channels Ann / B. Roux // Rev. Biophys. Biomol. Struct. — 2005. — Vol. 34. — P. 153–171.
24. Thomson, J. F. Effects of total body X-irradiation on phosphate esterification and hydrolysis in mitochondrial preparation of rat spleen / J. F. Thomson // Rad. Res. — 1964. — Vol. 21. — P. 46–60.
25. Yost, M. T. Uncoupling of oxidative phosphorylation in rat liver and spleen mitochondria by exposure to total-body irradiation / M. T. Yost, H. H. Robson, H. T. Yost // Rad. Res. — 1967. — Vol. 32. — P. 187–199.

Поступила 17.09.2007

УДК 616 – 073.3 – 092.9

### ПРЕИМУЩЕСТВА ЭХОКАРДИОГРАФИЧЕСКОГО ОБСЛЕДОВАНИЯ КРЫС БЕЗ ПРИМЕНЕНИЯ ОБЩЕЙ АНЕСТЕЗИИ

Н. А. Грицук

Гомельский государственный медицинский университет

Трансторакальная эхокардиография является наиболее эффективным и неинвазивным методом изучения сердечной функции. В работе описываются преимущества проведения эхокардиографического обследования крыс без применения общей анестезии.

Ключевые слова: эхокардиография, лабораторные крысы, анестезия.

### ADVANTAGES OF ECHOCARDIOGRAPHIC DETERMINATION AT RATS WITHOUT APPLICATION OF THE GENERAL ANESTHESIA

N. A. Gritsuk

Gomel State Medical University

The transthoracic echocardiography is one of most efficient and noninvasive method for determination of cardiac function. In the paper are described advantages of technique for echocardiographic determination of murine cardiac function without application of the general anesthesia.

Key words: echocardiography, rats, anesthesia.