

**А.Г. Логинов**

## **СОСТОЯНИЕ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МЕТАБОЛИЗМА ЛИМФОЦИТОВ РЕГИОНАРНОГО ЛИМФАТИЧЕСКОГО УЗЛА ПРИ ИМПЛАНТАЦИИ НИКЕЛИДА ТИТАНА**

ГОУ Новосибирская государственная медицинская академия МЗ РФ,  
ГУ НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН

В эксперименте на 80 белых крысах Вистар изучена дегидрогеназная активность (СДГ, ЛДГ,  $\alpha$ -ГФДГ) митохондриальная и цитоплазматическая, НАДН-Д) лимфоцитов регионарного лимфатического узла в динамике эксперимента по внутрикостной имплантации никелида титана. Детальный анализ активности дегидрогеназ показал, что имплантация никелида титана вызывает изменения энергетического статуса лимфоцитов. При этом отмечаются существенные различия в динамике активности окислительно-восстановительных ферментных систем: умеренное повышение активности СДГ и снижение активности НАД-зависимых дегидрогеназ отражает нарушение основного пути энергообеспечения клеток. В этих условиях повышается значение резервных: увеличивается активность челночных систем ( $\alpha$ -ГФДГ), координирующих взаимосвязь процессов дыхания и гликолиза, а также намечается тенденция к анаэробному пути энергопродукции — активации гликолиза (ЛДГ). Поскольку центральное место в проблеме биосовместимости принадлежит иммунным процессам, то отмеченные изменения энергетического метаболизма лимфоцитов могут быть расценены как показатель иммунной перестройки организма.

**Ключевые слова:** лимфатический узел, дегидрогеназы лимфоцитов, имплантация никелида титана

Исследование механизмов взаимодействия конструкционных материалов с биологическими средами сохраняет свою актуальность. Особое значение эта проблема приобретает в связи с широким внедрением в практику методов дентальной имплантации. Несомненные успехи последних лет, связанные с созданием принципиально новых имплантационных материалов на основе никелида титана [4], проявляющих при температуре тела сверхэластичные свойства, требуют их верификации в тканевых структурах. С развитием лимфологии открылись новые возможности для определения методического подхода к оценке действия на организм имплантационного материала. Интерес биологов и клиницистов к изучению ферментативной активности внутриклеточного метаболизма лимфоцитов объясняется, с одной стороны, филогенетически закрепленной способностью лимфоцитов быстро реагировать на любые изменения гомеостаза, с другой, — тем, что изменение активности ферментов лимфоцитов проявляется значительно раньше, чем количественные изменения в лейкоцитарной формуле, белках сыворотки крови и т.д.

Исследования Р.П. Нарциссова и его сотрудников (1969-1980) показали, что лимфоцит является «энзиматическим зеркалом», отражающим

состояние обменных процессов, происходящих во внутренних органах, непосредственное морфологическое исследование которых невозможно. Это дало основание Р.П. Нарциссову [5] назвать цитологический анализ ферментного статуса лимфоцитов «опосредованной биопсией», которая позволяет судить о состоянии обменных процессов целого ряда органов и систем. Цитоэнзимология лимфоцитов может дать представление о количественных изменениях в популяциях лимфоцитов, о субпопуляционных перестройках, о прогнозе и характере течения, тяжести, эффективности лечения того или иного заболевания, динамике процесса адаптации [8, 9].

В связи с этим **целью** настоящего исследования являлось изучение дегидрогеназной активности лимфоцитов регионарного лимфатического узла в динамике эксперимента по внутрикостной имплантации никелида титана.

**Материал и методы исследования.** Исследования проводили на 80 белых крысах-самцах линии Вистар массой тела 180-200 г, полученных из питомника НИИ цитологии и генетики СО РАН. Животных разделили на 2 группы: первая группа ложнооперированных животных была контрольной; животных второй группы подвергали экспе-

риментальной имплантации никелида титана. Для моделирования имплантации под эфирным наркозом шаровидным бором формировали имплантатное ложе в альвеолярном отростке нижней челюсти в области моляров, после чего вводили образец сплава никелида титана (ТН-10). Операционную рану ушивали. Группу ложнопериованных животных составляли животные со сформированным имплантатным ложем без введения образца никелида титана. Лимфоциты изучали на мазках-отпечатках, полученных с разреза поверхностных шейных лимфоузлов, расположенных на верхнем полюсе поднижнечелюстной слюнной железы на 7-е, 14-е, 30-е и 60-е сутки после операции имплантации. Контролем служили мазки-отпечатки указанных лимфоузлов ложнопериованных животных. Животных выводили из эксперимента путем декапитации в эфирном наркозе. В каждой группе использовали по 10 животных.

В лимфоцитах определяли цитохимические показатели активности важнейших внутриклеточных ферментов: лактатдегидрогеназы [L-лактат НАД-оксидоредуктаза, (КФ 1.1.1.27), ЛДГ], катализирующей заключительный этап гликолиза — обратную реакцию восстановления пирувата в лактат; сукцинатдегидрогеназы [сукцинат; (акцептор) — оксидоредуктаза, (КФ 1.3.99), СДГ], катализирующей реакцию окисления сукцината в фумарат в цикле Кребса; НАДН-диафоразы (КФ 1.6.99.1, НАДН-Д); глицерофосфатдегидрогеназы митохондриальной [L-глицерол-3-фосфат: акцептор-оксидоредуктаза, (КФ 1.1.99.5),  $\alpha$ -ГФДГ(м)], глицерофосфатдегидрогеназы цитоплазматичес-

кой [L-глицерол-3-фосфат: НАД-оксидоредуктаза, (КФ 1.1.1.8)  $\alpha$ -ГФДГ(ц)] — как ключевых ферментов цепи переноса электронов.

Активность ферментов оценивали количественным методом Р.П. Нарциссова [5] в модификации М.В. Робинсон [9], основанным на подсчете образованных в клетке видимых гранул формазана, при использовании п-нитротетразолия фиолетового в 30-50 лимфоцитах. Значимость результатов оценивали с помощью t-критерия Стьюдента.

### Результаты исследования и обсуждение

Проведенное исследование свидетельствует об изменении энергетического метаболизма лимфоцитов регионарного лимфоузла при эндооссальной имплантации никелида титана в различные сроки наблюдения.

**СДГ.** Имплантация никелида титана приводила к изменению активности фермента СДГ лимфоцитов регионарного лимфоузла в динамике исследования (рис. 1). На 7-е сутки активность СДГ достоверно не отличалась от контрольного значения. На 14-е сутки активность фермента увеличивалась до  $16,68 \pm 1,01$ , что превышало контрольное значение на 25,03%. На 30-е сутки исследования активность СДГ увеличивалась до  $17,33 \pm 0,58$  и достоверно превышала контрольное значение на 28,45%. К 60-м суткам исследования активность СДГ снижалась до  $15,21 \pm 0,54$ , но и это значение активности фермента достоверно превышало контрольное значение соответствующего срока исследования на 16,92%. Следует отметить, что активность СДГ на протяжении всего эксперимента оставалась повышенной, достигая максимума к 30-м суткам. Лим-

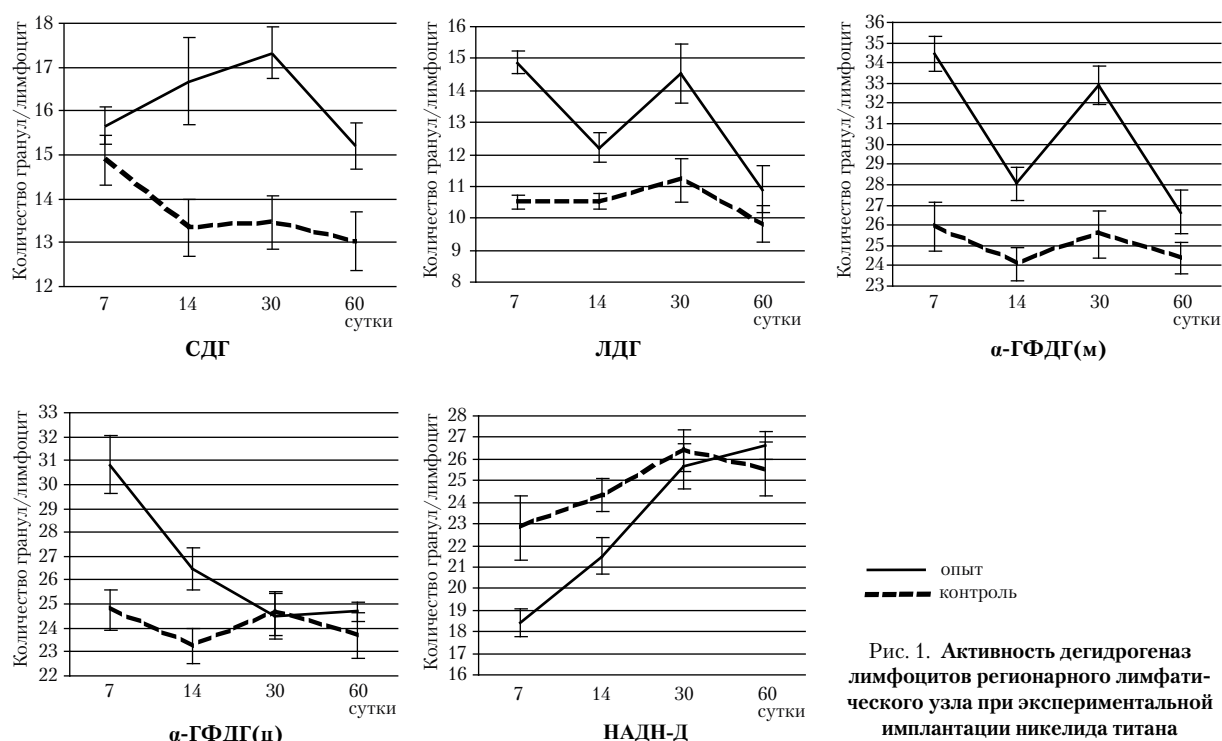


Рис. 1. Активность дегидрогеназ лимфоцитов регионарного лимфатического узла при экспериментальной имплантации никелида титана

фоциты относятся к клеткам с преимущественно аэробным типом обмена [9, 10]. СДГ имеет важное метаболическое значение, поскольку предполагается, что в клетках, богатых этим ферментом, не происходит накопления лактата, и можно ожидать полного окисления глюкозы через цикл трикарбоновых кислот с высвобождением большого количества энергии. Именно этим можно объяснить повышение активности СДГ. Повышение энергетического потенциала клетки, реализуемое за счет повышения активности СДГ, возможно, является проявлением адаптивной реакции клетки на имплантируемый никелид титана, что связано с его биологическим действием. Снижение активности СДГ к 60-м суткам наблюдения может быть объяснено пассивацией сплава, наблюдаемой после 30-х суток [2].

**ЛДГ.** Изменение активности ЛДГ в ходе эксперимента носило фазовый характер: периоды максимальной активности фермента — 7-е и 30-е сутки ( $14,88 \pm 0,35$  и  $14,5 \pm 0,92$  соответственно), а на 14-е и 60-е сутки активность фермента минимальна ( $12,2 \pm 0,46$  и  $10,9 \pm 0,73$ ), но и в эти сроки активность ЛДГ в экспериментальной группе выше, чем в контрольной (рис. 1). Повышение активности ЛДГ связано с изменениями интенсивности гликолиза, биологическое значение которого заключается в образовании богатых энергией фосфорных соединений. Высокая активность ЛДГ при имплантации никелида титана свидетельствует об интенсификации энергообеспечения лимфоцитов за счет включения анаэробного гликолиза. Активирование анаэробного пути окисления может быть расценено как компенсаторный механизм повышения адаптивной реакции иммунной системы на воздействие имплантированного материала (ферментно-метаболическая адаптация). В этом случае возможна быстрая и адекватная генерация энергии в клетке [3], этот механизм обеспечивает стабильность энергетического гомеостаза в условиях, когда клетке требуются дополнительные эквиваленты энергии, и свидетельствует о сохранности механизмов энергообеспечения в лимфоцитах.

**НАДН-Д.** Активность НАДН-Д не одинакова в разные сроки эксперимента по имплантации никелида титана. Наименьшая активность этого фермента отмечена на 7-е сутки —  $18,42 \pm 0,63$  (в контроле —  $22,82 \pm 1,48$ ). На 14-е сутки эксперимента активность повышалась на 16,42% и составляла  $21,50 \pm 0,84$  (в контроле —  $24,32 \pm 0,76$ ). К 30-м суткам наблюдения активность фермента в группе экспериментальных животных увеличивалась на 19,29% по сравнению с 14-ми сутками эксперимента. Вследствие такой динамики процесса на 30-е сутки нет достоверных различий в активности НАДН-Д животных контрольной и опытной групп ( $26,36 \pm 1,56$  и  $25,67 \pm 1,05$  соответственно). На 60-е

сутки эксперимента активность фермента в группе животных с имплантацией никелида титана увеличилась еще на 3,47%, а в контрольной группе снизилась на 3,20% и составила соответственно  $26,64 \pm 0,65$  и  $25,54 \pm 1,23$ .

НАДН-Д наряду с СДГ играет наиболее важную роль среди флавиновзависимых дегидрогеназ. Они катализируют перенос электронов НАД-Н к акцептору — к одному из белков дыхательной цепи, содержащему негеминное железо. Флавопротеиды играют роль промежуточных переносчиков электронов между дегидрогеназами и цитохромами. Молекулы — переносчики электронов — сгруппированы в надмолекулярные структуры, так называемые «дыхательные ансамбли». Эти дыхательные ансамбли, содержащие строго определенное количество молекул каждого из переносчиков электронов, в свою очередь, встроены в структуру внутренней митохондриальной мембраны. Динамика изменения активности НАДН-Д позволяет проанализировать состояние механизмов, обеспечивающих динамическое равновесие окислительно-восстановительных реакций, протекающих в лимфоцитах при имплантации. Дыхательный ансамбль напоминает каскадное устройство, поставляющее клетке свободную энергию удобными для нее порциями. Реакции окислительного фосфорилирования сохраняют приблизительно 40% энергии, высвобождающейся в процессе переноса электронов.

Изучение динамики активности НАДН-Д лимфоцитов регионарного лимфоузла в условиях экспериментальной имплантации никелида титана позволяет констатировать существенное снижение активности фермента на 7-е и 14-е сутки эксперимента, а на 30-е и 60-е сутки не отмечено достоверных отличий в активности НАДН-Д контрольной и экспериментальной групп животных.

Внутримитохондриальный пул АТФ и АДФ отделен от цитоплазматического пула, но между ними возможен обмен, осуществляемый переносчиком. Между цитоплазмой и внутренним отделением митохондрий происходит также очень сложный двусторонний обмен промежуточными продуктами цикла трикарбоновых кислот и фосфатом. Восстановительные эквиваленты цитоплазматического НАД-Н могут поступать внутрь митохондрий непрямым путем, с помощью глицерофосфатного челночного механизма. Благодаря наличию такого механизма электроны, освобождающиеся на окислительной стадии гликолиза в цитоплазме, включаются в сеть переноса электронов в митохондриях, в результате чего конечным продуктом реакций в аэробных условиях оказывается пируват. Существуют специальные челночные механизмы, осуществляющие перенос восстановительных эквивалентов из митохондрий, где они возникают, в

цитоплазму. Наибольшее значение отводится глицерофосфатному челночному механизму.

**$\alpha$ -ГФДГ митохондриальная.** На протяжении всего эксперимента активность  $\alpha$ -ГФДГ(м) была достоверно выше, чем в контрольной группе животных (рис. 1). Периоды максимальной активности фермента — 7-е и 30-е сутки, когда она превышала значение контроля на 32,95 и 28,74% соответственно, на 14-е сутки эксперимента активность  $\alpha$ -ГФДГ(м) была выше контроля на 16,43%, а на 60-е сутки — на 9,17%. Колебания высокой амплитуды, характерные для  $\alpha$ -ГФДГ митохондриальной, при имплантации никелида титана являются, по мнению Р.П. Нарциссова [6], неблагоприятным прогностическим признаком, который значительно опережает возможные негативные иммунологические и клинические проявления.

**$\alpha$ -ГФДГ (цитоплазматическая).** Наиболее высокая активность  $\alpha$ -ГФДГ(ц) отмечена на 7-е сутки исследования ( $30,83 \pm 1,2$ ), что превышало значение контроля на 24,51%, к 14-м суткам эксперимента активность снижалась до  $26,48 \pm 0,89$ , что превысило значение контрольной группы на 14,03%. В период с 14-х по 30-е сутки отмечено дальнейшее снижение активности  $\alpha$ -ГФДГ(ц), вследствие чего на 30-е и 60-е сутки эксперимента не было достоверных отличий по сравнению с контролем (рис. 1). Описанная динамика отражает усиление координирующей роли глицерофосфатного шунта, усиление соподчиненности различных ферментов энергообеспечения клетки, что позволяет ей наиболее экономно использовать белковые катализаторы [1, 7].

**Заключение.** Экспериментальная имплантация никелида титана вызывает изменение энергетического статуса лимфоцитов регионарного лимфатического узла. При этом отмечены существенные различия в динамике активности окислительно-восстановительных ферментных систем: умеренное повышение активности СДГ и снижение активности НАД-зависимых дегидрогеназ отражает нарушение основного пути энергообеспечения клеток. В этих условиях повышается значение резервных: увеличивается активность челночных систем ( $\alpha$ -ГФДГ), координирующих взаимосвязь процессов дыхания и гликолиза, а также намечается тенденция к анаэробному пути энергопродукции — активации гликолиза (ЛДГ). Поскольку центральное место в проблеме биосовместимости принадлежит иммунным процессам, то отмеченные изменения энергетического метаболизма лимфоцитов могут быть расценены как показатель иммунной перестройки организма. Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности проведения коррекции энергетического метаболизма иммунокомпетентных клеток, находящихся в состоянии энергетического напряжения.

## State of energetic metabolism of regional lymph node lymphocytes at titan nickelide implantation

A.G. Loginov

Dehydrogenase activity of lymph node lymphocytes in dynamics at titan nickelide implantation is studied. It is shown that titan nickelide implantation causes the changes of energetic status of lymphocytes with essential distinctions in activity of oxidation-reduction fermental systems. The moderate increase of SDH activity (succinate dehydrogenase) and the decrease of NAD activity (nicotinamide adenine dinucleotide) — dependent dehydrogenases take place, that reflects a disturbance of the basic way of energetic supply. The activity of shuttle systems ( $\alpha$ -GPDH;  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase) coordinating the interaction between breathing process and glycolise increases, and a tendency to anaerobic way of energetic production with using glycolise (LDG; lactate dehydrogenase) is marked. As a central place in the problem of biocompatibility belongs to immune processes, the marked changes of energetic metabolism of lymphocytes can be determined as a parameters of immune reorganization of an organism.

## Литература

1. Булыгин Г.В. Метаболический статус лимфоцитов периферической крови в механизмах адаптации человека к новым экологическим условиям: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук / Г.В. Булыгин. — Томск, 1992. — 34 с.
2. Гожая Л.Д. Аллергические заболевания в ортопедической стоматологии / Л.Д. Гожая. — М., 1988.
3. Ленинджер А. Основы биохимии: перевод с английского / А. Ленинджер. — М., 1985.
4. Медицинские материалы и имплантаты с памятью формы / В.Э. Гюнтер, Г.Ц. Дамбаев, П.Г. Сысолятин П.Г. и др. — Томск, 1998.
5. Нарциссов Р.П. Применение п-нитротетразолия фиолетового для количественной цитохимии дегидрогеназ лимфоцитов человека / Р.П. Нарциссов // Арх. анат. — 1969. — № 5. — С. 55-91.
6. Нарциссов Р.П. Прогностические возможности клинической цитохимии / Р.П. Нарциссов // Советская педиатрия. Выпуск 2. — М., 1984. — С. 267-275.
7. Полонская М.Г. Исследование динамики корреляционных связей между физиологическими параметрами на разных стадиях патологического процесса: Автореф. дис. ... канд. мед. наук / М.Г. Полонская. — Красноярск, 1992. — 18 с.
8. Робинсон М.В. Морфология и метаболизм лимфоцитов / М.В. Робинсон, Л.Б. Топоркова, В.А. Труфакин — Новосибирск, 1986.
9. Робинсон М.В. Морфоцитохимические особенности лимфоцитов в норме при дестабилизирующих воздействиях и при аутоиммунных процессах и заболеваниях: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук / М.В. Робинсон. — Новосибирск, 1994. — 58 с.
10. Соколов В.В. Цитохимия ферментов в профпатологии / В.В. Соколов, Р.П. Нарциссов, Л.А. Иванова. — М., 1975.