

УДК 576.314+577.115

Г. Г. Горюшко, Г. С. Григор'єва, Н. Ф. Коначович,  
О. М. Величко

#### ВПЛИВ КВЕРЦЕТИНУ НА СТРУКТУРУ І ВЛАСТИВОСТІ ФОСФОЛІПІДНОГО БІШАРУ ЛІПОСОМ

Методами ІЧ-спектроскопії, мікрокалориметрії та флуоресцентного зондування досліджено взаємодію кверцетину з фосфоліпідними ліпосомами. Вперше отримано дані про структурну модифікацію ліпосом внаслідок входження кверцетину в гідрофобну ділянку фосфоліпідного бішару. Підвищена мембранотропність ліпосомальної форми кверцетину, порівняно з вільним Кв, супроводжується зниженням мікрров'язкості та деполаризацією мембрани.

**Ключові слова:** кверцетин, ліпосоми, біомембрани.

UDC 576.314+577.115

G. G. Goryushko, G. S. Grygoryeva, N. F. Konakchovich, O. M. Velichko

#### THE INFLUENCE OF QUERCETIN AT THE STRUCTURE AND PROPERTIES OF THE PHOSPHOLIPID BILAYER OF THE LIPOSOMES

The interaction of quercetin with phospholipid liposomes was investigated by the IR-spectroscopy, microcalorimetry and fluorimetry-probe methods. For the first time data about the liposome structural modification owing to the quercetin entry into hydrophobic area of the phospholipid bilayer were obtained. The heightened membrane tropism of the liposomic quercetin, as compared with the free quercetin, was accompanied by the microviscosity reduction and the membrane depolarization.

**Key words:** quercetin, liposome, biomembrane.

УДК 612.438:612.75:577.73

А. Н. Устименко,

Л. Н. Пашинян,

А. Е. Родниченко,

Л. В. Магдич, канд. биол. наук,

Г. М. Бутенко, акад. АМН України

## ВЛИЯНИЕ ТИМЭКТОМИИ В НЕОНАТАЛЬНОМ ВОЗРАСТЕ НА ПЛОТНОСТЬ БЕДРЕННОЙ КОСТИ У МЫШЕЙ ЛИНИИ СВА/СА

*Институт геронтологии АМН Украины, Киев*

### Вступление

Тот факт, что тимус у новорожденных и молодых животных имеет большие размеры и что он подвергается инволюции у взрослых, послужил поводом высказать предположение, что тимус участвует в процессах роста организма. У животных, лишенных тимуса, было отмечено угнетение процессов роста, сопровождающееся дефектами ossification, остеопорозом и гипоплазией костей [3]. Кроме того, возрастная инволюция тимуса и возрастные изменения в функции половых желез указывают на взаимосвязь между этими двумя органами. Отмечено, что у мышей, подвергнутых тимэктомии в неонатальном периоде, наблюдалась атрофия яичников и эпидидимоорхиты [18]. Тимус яв-

ляется центральным органом иммунной системы. В нем происходит созревание и дифференцировка Т-лимфоцитов, которые также принимают участие в метаболизме костной ткани. Данные о влиянии лимфоцитов на костный метаболизм подтверждаются тем фактом, что они секретируют факторы некроза опухоли  $\alpha$  и  $\beta$  (ФНО- $\alpha$  и  $\beta$ ), которые стимулируют костную резорбцию [19]. Другой продукт секреции лимфоцитов —  $\gamma$ -интерферон — является потенциальным ингибитором интерлейкин-1 (ИЛ-1) стимулированной костной резорбции в органной культуре и подавляет формирование остеобластных клеток в костномозговой культуре клеток человека [20]. Клетки костного мозга обладают остеогенными свойствами. Главные участники ремо-

делирования кости — остеокласты и остеобласты — происходят из гемопоэтических предшественников, подобных гранулоцитарно-макрофагальным колониеобразующим клеткам (КОК-ГМ), и мезенхимальных стволовых клеток, входящих в состав стромы костного мозга, подобных колониеобразующим клеткам фибробластов (КОК-Ф) [1; 13]. Процесс ремоделирования контролируется системной и локальной продукцией цитокинов, а баланс процессов резорбции и формирования кости обеспечивает сохранение нормальной костной массы [12–14]. Существуют факторы, которые были независимо открыты в костной и иммунной системах, они специфически влияют на развитие и дифференцировку остеокластов: рецептор, активирующий ядер-

ный фактор NF- $\kappa$ B (RANK), остеопротегерин (OPG) и остеопротегерин-лиганд (OPGL) [10; 11; 16; 17]. Эта система необходима для нормального развития и функционирования остеокластов, дендритных клеток, Т- и В-лимфоцитов [5; 9].

**Целью** данного исследования явилось изучение влияния тимэктомии на ранних этапах онтогенеза мышей линии СВА/Са на плотность кости, массу животных, массу надпочечников, матки и тестикул, уровень половых гормонов в сыворотке крови, количество костномозговых клеток-предшественников для гранулоцитарно-макрофагальных колоний (КОК-ГМ) и колоний фибробластов (КОК-Ф).

#### Материалы и методы исследования

В эксперименте использовали самцов и самок мышей линии СВА/Са стадного разведения питомника Института геронтологии АМН Украины. Тимэктомия животным проводилась соответственно рекомендациям [2; 8] в трехдневном возрасте. Контрольная группа — ложнооперированные животные того же возраста. Через 3,5 мес после воздействия животных исследовали. Эвтаназию проводили под эфирным наркозом. Для исследования извлекались бедренная кость, костный мозг, матка, тестикулы, кровь.

Для приготовления костномозговых клеточных суспензий бедренные кости мышей в стерильных условиях очищали от мышечной ткани, эпифизарные концы срезали и вымывали содержимое костномозговой полости питательной средой RPMI-1640, используя шприц и иглы разного диаметра.

КОК-Ф оценивали методом культивирования клеток костного мозга в монослойных культурах. Клетки с начальной плотностью  $2 \cdot 10^5$ /см<sup>2</sup> внесли в стерильные пластиковые флаконы площадью 25 см<sup>2</sup> с питательной средой, в состав

которой входили 85 % RPMI-1640, 15 % эмбриональная сыворотка коров, 10 мМ L-глутамина, 20 мМ Нерес. Через 12 сут культивирования клеток при 37 °С в увлажненной атмосфере, состоящей из 10 % CO<sub>2</sub> и 90 % атмосферного воздуха, питательную среду сливали, промывали физиологическим раствором (0,9%-й раствор NaCl) и фиксировали 96%-м этиловым спиртом. Окрашивали по Романовскому — Гимзе. Колонии, состоящие не менее чем из 50 клеток, подсчитывали под бинокулярным микроскопом.

Количество КОК-ГМ определяли в агаровых культурах. Колониестимулирующим фактором служила кондиционная среда, полученная из культур клеток селезенки взрослых мышей через 72 ч инкубации с 5 мкг Кона. На 8-е сутки культивирования ( $10^6$  клеток костного мозга в среде McCoу с добавками) под бинокулярным микроскопом подсчитывали число колоний, в состав

которых входило не менее 50 клеток. Число КОК-Ф и КОК-ГМ пересчитывали на общее количество ядросодержащих клеток в бедренной кости.

Уровень половых гормонов изучали, используя набор реактивов для радиоиммунологического определения тестостерона и эстрадиола в сыворотке крови человека («РИА — Тестостерон — ПР» и «РИА — Эстрадиол — ПР», Беларусь).

Плотность кости определяли гравиметрическим методом [4].

Достоверность различий средних оценивали с помощью критерия Стьюдента для независимых выборок. Для вычисления использовали программный пакет Statistica 6.0

#### Результаты исследования и их обсуждение

Результаты исследований влияния тимэктомии у мышей трехдневного возраста представлены в табл. 1 и 2.

Как видно из табл. 1, тимэктомия в трехдневном возрасте

Таблица 1

Изменение массы животных, массы надпочечников, матки, тестикул и уровня половых гормонов при тимэктомии мышей в трехдневном (Тх3) возрасте

Показатели	Контроль	Тх3
Самцы		
Масса мышши, г	n=13 21,68±1,01	n=11 18,93±0,79*
Масса надпочечников, мг	n=13 3,73±0,26	n=11 4,48±0,24*
Масса тестикул, мг	n=13 117,92±1,70	n=11 108,16±2,80**
Эстрадиол, нмоль/л	n=9 82,84±13,45	n=8 44,86±7,75*
Самки		
Масса мышши, г	n=17 18,05±0,45	n=16 16,46±0,61*
Масса надпочечников, мг	n=17 3,91±0,21	n=16 4,90±0,21*
Масса матки, мг	n=17 81,17±6,57	n=16 51,94±8,44**
Эстрадиол, нмоль/л	n=12 0,56±0,03	n=16 0,45±0,03**

*Примечание.* На момент эксперимента возраст животных составлял 3–3,5 мес; \* — P<0,05 при сравнении с контрольной группой; \*\* — P<0,01 при сравнении с контрольной группой.

Изменение количества КОК-Ф, КОК-ГМ и плотности кости после тимэктомии мышей в трехдневном возрасте

Показатели	Самцы		Самки	
	Контроль	Тх 3	Контроль	Тх 3
Концентрация КОК-Ф/10 <sup>6</sup>	n=13 39±4	n=12 59±6*	n=17 45±5	n=16 59±4*
Общее количество в одном бедре КОК-Ф	n=13 504±98	n=12 863±147*	n=17 636±111	n=16 936±104*
Концентрация КОК-ГМ/10 <sup>6</sup>	n=7 53±10	n=11 107±8**	n=13 63±7	n=15 103±7**
Общее количество в одном бедре КОК-ГМ	n=7 630±222	n=11 1485±227*	n=13 847±167	n=15 1593±160**
Соотношение КОК-Ф / КОК-ГМ	n=7 0,69±0,04	n=11 0,53±0,03*	n=13 0,86±0,04	n=15 0,54±0,03*
Плотность костной ткани, г/см <sup>3</sup>	n=10 1,96±0,08	n=12 1,51±0,06**	n=16 1,88±0,03	n=15 1,48±0,03**

*Примечание.* На момент эксперимента возраст животных составлял 3–3,5 мес; \* —  $P < 0,05$  при сравнении с контрольной группой; \*\* —  $P < 0,005$  при сравнении с контрольной группой.

через 3,5 мес привела к достоверному снижению массы тела как у самок, так и у самцов по сравнению с ложноперирированными животными ( $P < 0,05$ ). Однако синдрома истощения (Wasting-синдром), развивающегося после тимэктомии в первые часы жизни и приводящего к кахексии, генерализованной инфекции и последующей гибели животных в течение 4–6 мес, в нашем эксперименте не наблюдалось. Происходит достоверное снижение массы тестикул, массы матки и уровня половых гормонов — тестостерона и эстрадиола — в сыворотке крови при сравнении с контрольными группами ( $P < 0,05$  и  $P < 0,01$  соответственно). Нарушенное гормональное равновесие, очевидно, связано с изменениями в системах гипофиз — тимус — надпочечники и гипофиз — тимус — половые железы. У мышей, тимэктомированных в трехдневном возрасте, со временем может развиваться ряд органоспецифических аутоиммунных заболеваний, включая аутоиммунный дисгенез яичников. Фенотипически данный синдром характеризуется вы-

работкой антиовариальных аутоантител, развитием оофоритов и последующей атрофией яичников [6; 7; 18].

У тимэктомированных животных достоверно увеличивается масса надпочечников ( $P < 0,05$ ), что может иметь компенсаторный характер и позволяет предположить о существовании тимусзависимой зоны в надпочечниках, для нормального созревания которой требуется тимус в раннем постнатальном периоде [3].

Результаты исследований влияния тимэктомии в трехдневном возрасте на показатели состояния костной ткани у мышей представлены в табл. 2. Как у самцов, так и у самок отмечено достоверное увеличение относительного и абсолютного количества КОК-Ф и КОК-ГМ ( $P < 0,05$ ). Достоверно уменьшалось соотношение КОК-Ф и КОК-ГМ у самцов и самок при сравнении с контрольной группой ( $P < 0,05$ ). Данный факт может косвенно свидетельствовать о преобладании предшественников остеокластов и об усилении процесса резорбции в кости, что отразилось в достоверном снижении ее плотности ( $P < 0,005$ ).

## Выводы

Поскольку известно, что на процесс ремоделирования кости во взрослом организме важную роль оказывают зрелые Т-клетки, обеспечивающие системную и локальную продукцию цитокинов [9; 12], проведенные исследования позволяют заключить, что на ранних этапах развития тимус оказывает выраженное регуляторное действие на формирование костной ткани. Тимэктомия также приводит к увеличению массы надпочечников, что может свидетельствовать о повышении секреторной активности коркового слоя и повышении выделения глюкокортикоидных гормонов [3]. Возможно, отсутствие тимусного лимфопоза, а также тимических факторов именно в раннем постнатальном периоде ведет к количественному и качественному дисбалансу между костномозговыми клетками-предшественниками для гранулоцитарно-макрофагальных колоний и колоний фибробластов, что может быть причиной снижения плотности костной ткани при старении. Возможно, взаимодействуя с гипоталамусом по принципу положительной обратной связи и стимулируя секрецию веществ, которые влияют на секрецию гормона роста аденогипофизом, тимус поддерживает уровень гормона роста и тироксина в крови, которые необходимы для роста и развития костей [15].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бутенко Г. М. Остеопороз и иммунная система // Проблемы остеологии. — 1999. — Т. 2, № 3. — С. 23–28.
2. Зинзар С. Н. Первичный иммунологический ответ у неонатально тимэктомированных мышей // Бюл. экспер. биологии и медицины. — 1968. — № 1. — С. 81–84.
3. Кемилева З. Вилочковая железа. — М.: Медицина, 1984. — 256 с.
4. Пашиян Л. Н., Устименко А. М., Пишель И. М. Гравиметрический метод как экспрес-метод визначення щільності стегнових кісток у мишей

- // Вісн. проблем біології і медицини. — 2005. — Вип. 1. — С. 26-31.
5. *A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cells function* / D. M. Anderson, E. Maraskovsky, W. L. Billingsley et al. // *Nature*. — 1997. — Vol. 390. — P. 175-179.
  6. *Besedovsky H. O., Sorkin E.* Thymus involvement in female sexual maturation // *Nature*. — 1974. — Vol. 249. — P. 356-358.
  7. *Bonomo A., Kehn P. I., Shevach E. M.* Post-thymectomy autoimmunity: abnormal T-cell homeostasis // *Immunol. Today*. — 1995. — Vol. 16. — P. 61-67.
  8. *Cohn D. A.* Rapid, safe and simple method for grafting whole thymus in the mouse // *J. Immunol. Methods*. — 1976. — Vol. 12, N 34. — P. 377-385.
  9. *Cellular and molecular interactions between immune system and bone* / D. Grčević, V. Katavić, I. Lukić et al. // *Croatian Medical Journal*. — 2001. — Vol. 42, N 4. — P. 384-392.
  10. *The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption* / L. C. Hofbauer, S. Khosla, C. R. Dunstan et al. // *J. Bone Miner. Res.* — 2000. — Vol. 15. — P. 3-12.
  11. *Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation* / D. L. Lacey, E. Timms, H. L. Tan et al. // *Cell*. — 1998. — Vol. 93. — P. 165-176.
  12. *Lorenzo J. A.* Interactions between immune and bone cells: new insights with many remaining questions // *J. Clin. Invest.* — 2000. — N 106. — P. 749-752.
  13. *Manolagas S. C.* Cellular and molecular mechanisms of osteoporosis // *Aging. Clin. Exp. Res.* — 1998. — Vol. 10. — P. 183-190.
  14. *A comparison of bone turnover in athymic (nude) mice and in vitro studies* / L. Mc Cauley, T. J. Rosol, C. C. Capen et al. // *Bone*. — 1989. — Vol. 10. — P. 29-34.
  15. *Long bone growth changes in thymectomized rats in the pre-puberal stage* / D. Teixeira, A. Guimaraes, W. Rino et al. // *Rev. Bras. Pesqui Med. Biol.* — 1978. — Vol. 11, N 1. — P. 1-7.
  16. *TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-jun N – terminal kinase in T cells* / B. R. Wong, J. Rho, J. Arron et al. // *J. Biol. Chem.* — 1997. — Vol. 272. — P. 25190-25194.
  17. *Yasuda H.* Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis — inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1998. — Vol. 95. — P. 3597-3602.
  18. *AOD1, the immunoregulatory locus controlling abrogation of tolerance in neonatal thymectomy – induced autoimmune ovarian dysgenesis, maps to mouse chromosome 16* / B. B. Wardell, S. D. Michael, K. S. K. Tung et al. // *National Academy of Sciences*. — 1995. — Vol. 92. — P. 4758-4762.
  19. *Tumors producing human TNF induce hypercalcemia and osteoclastic bone resorption in nude mice* / R. A. Jonson, B. F. Boyce, G. R. Mundy et al. // *Endocrinology*. — 1989. — Vol. 24. — P. 1424-1427.
  20. *Gowen M., Mundy G.R.* Actions of recombinant interleukin 1, interleukin 2, and interferon, on bone resorption in vitro // *J. Immunol.* — 1986. — Vol. 136. — P. 2478-2482.

УДК 612.438:612.75:577.73

А. Н. Устименко, Л. Н. Пашинян, А. Е. Родниченко, Л. В. Магдич, Г. М. Бутенко

**ВЛИЯНИЕ ТИМЭКТОМИИ В НЕОНАТАЛЬНОМ ВОЗРАСТЕ НА ПЛОТНОСТЬ БЕДРЕННОЙ КОСТИ У МЫШЕЙ ЛИНИИ СВА/СА**

Изучена связь между тимусом и формированием костной ткани у самцов и самок мышей линии СВА/Са. Установлено, что после тимэктомии, проведенной в трехдневном возрасте, плотность бедренных костей достоверно снижается как у самцов, так и у самок; отмечено достоверное снижение массы матки, тестикул и уровня половых гормонов; достоверно увеличиваются масса надпочечников, относительное и абсолютное количество КОК-Ф и КОК-ГМ.

**Ключевые слова:** неонатальная тимэктомия, плотность бедренной кости, мыши.

UDC 612.438:612.75:577.73

A. N. Ustimenko, L. N. Pashynyan, A. E. Rodnichenko, L. V. Magdich, G. M. Butenko

**INFLUENCE OF THYMECTOMY AT THREE DAYS OF AGE ON THE BONE DENSITY IN MICE CBA/CA**

Influence of thymectomy at three days of age on the bone density have been studied in experiments on female and male CBA/CA mice. Gravimetric method of femoral bone density measurement was performed. At the age of three days thymectomy leads to significant decrease of bone density in female and male mice, significant increase of number colony forming unit of fibroblast (CFU-F) and number colony forming unit of granulocyte/macrophage (CFU-GM) for female and male mice. The body mass of mice, the mass of adrenal glands, uterus, testis and level of sex gormons were significantly decreased.

**Key words:** neonatal thymectomy, femoral bone density, mice.