

Архив журнала

## **Вопросы медицинской химии**

*ISSN 0042-8809*

1989 том 35 выпуск 3

**Внимание!** Распознавание текста проведено в автоматическом режиме для облегчения работы поисковых систем. Будьте внимательны при копировании, возможны ошибки и неточности.

## **Voprosy meditsinskoï khimii**

The journal archive

*ISSN 0042-8809*

1989 volume 35 issue 3

**Attention!** OCR has been performed automatically for search engines only. Be careful when copying, errors are possible.

<http://pbmc.ibmc.msk.ru>

ТОМ 35

ВЫПУСК 3

МАЙ — ИЮНЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.

# ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ



МОСКВА · МЕДИЦИНА · 1989



## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. С. ДЕБОВ

В. Б. СПИРИЧЕВ (зам. редактора), И. П. АШМАРИН, Т. Т. БЕРЕЗОВ, А. А. ВАСИЛЬЕВ, Е. Н. ГЕРАСИМОВА, В. З. ГОРКИН, И. Б. ЗБАРСКИЙ, В. Л. КОЗЕЛЬЦЕВ (ответственный секретарь), А. И. КЛИМОВ, Б. Ф. КОРОВКИН, Л. А. ЛОКШИНА, В. Н. ОРЕХОВИЧ, Л. Ф. ПАНЧЕНКО, М. Ш. ПРОМЫСЛОВ, Е. Л. РОЗЕНФЕЛЬД, Ю. А. РОМАКОВ, В. А. САКС, С. Е. СЕВЕРИН, В. А. ТУТЕЛЬЯН

## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

БАЕВ А. А. (Москва)

БЕЛИЦЕР В. А. (Киев)

БЫЧКОВ С. М. (Москва)

КОНСТАНТИНОВ А. А. (Хабаровск)

КУДРЯШОВ Б. А. (Москва)

ЛЯХОВИЧ В. В. (Новосибирск)

ПАСХИНА Т. С. (Москва)

ТРОИЦКИЙ Г. В. (Симферополь)

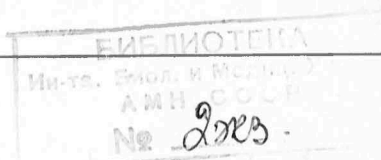
ТУРАКУЛОВ Я. Х. (Ташкент)

ТЯХЕПЫЛД Л. Я. (Тарту)

ШАПОВ В. С. (Москва)

ЯКОВЛЕВ Н. Н. (Ленинград)

ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)



И. Е. Петриченко, А. Ш. Шартава, Ю. А. Шахов

## О МЕХАНИЗМЕ АКТИВАЦИИ ГЛЮКОКОРТИКОИД-РЕЦЕПТОРНОГО АППАРАТА ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ОСТРОМ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА

НИИ профилактической кардиологии ВКНЦ АМН СССР, Москва

Глюкокортикоиды и их синтетические аналоги являются известными биологическими регуляторами метаболизма во многих тканях [1]. Механизм действия глюкокортикоидов включает связывание гормона со специфическим цитоплазматическим рецептором клетки-мишени, активацию гормона-рецепторного комплекса, его транслокацию в ядро и взаимодействие с определенными участками ДНК, чем и обусловлен физиологический ответ клетки на глюкокортикоидные гормоны [15]. Существует мнение, что число клеточных рецепторов отражает чувствительность клеток к гормонам [3, 23]. Показано, что количество рецепторов к глюкокортикоидам в клетке может изменяться в зависимости от концентрации гормона [19, 21], стадии клеточного цикла [12] и в трансформированных клетках [18, 22].

Лимфоциты крови являются удобным объектом исследования механизма действия глюкокортикоидов, поскольку содержат специфические рецепторы и являются клетками-мишенями для этих гормонов. Показано, что глюкокортикоиды обладают ингибирующим действием на клетки лимфоидной системы, подавляя в них синтез белка и холестерина, транспорт глюкозы [14]. Количество рецепторов к глюкокортикоидам в лимфоцитах, по данным ряда авторов, отражает их количество в других тканях организма [3, 11]. Вместе с тем известно, что специфическая активация лимфоцитов митогенами приводит к увеличению количества рецепторов, по-видимому, в результате их синтеза *de novo*. Изменяется ли при этом чувствительность лимфоцитов к глюкокортикоидам неясно, поскольку существующие данные весьма противоречивы [22]. Изучение особенностей функционирования глюкокортикоид-рецепторного аппарата лимфоцитов в условиях антигенной стимуляции представляется весьма важным для понимания ро-

ли этих гормонов в регуляции иммунного ответа.

Недавно факт увеличения числа рецепторов к глюкокортикоидам был обнаружен в лимфоцитах больных острым инфарктом миокарда (ОИМ) [8]. В настоящей работе исследуются биохимические факторы, способные вызвать увеличение уровня глюкокортикоидных рецепторов в лимфоцитах при ОИМ.

### Методика

Материалом служила кровь и сыворотка крови мужчин 40—55 лет больных острым трансмуральным инфарктом миокарда и практически здоровых доноров. Кровь брали из локтевой вены: для получения сыворотки — в сухие пробирки, для выделения лимфоцитов — в пробирки с ЭДТА (1 мг/мл). У больных ОИМ кровь брали не позднее 24 ч от начала болевого приступа. Лимфоциты выделяли центрифугированием в градиенте фиколла — пак («Pharmacia», Швеция) и суспендировали в среде 199 [10]. Жизнеспособность клеток определяли с трипановым синим и она составляла не менее 95 %. Моноциты составляли 5—7 % от общего числа клеток. Культуру фибробластов получали из биоптатов кожи человека; в экспериментах использовали клетки до 15-го пассажа. Фибробласты выращивали в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе (5 %  $\text{CO}_2$ , влажность 80 %, 37 °C) фирмы («Assab», Швеция) в пластиковых флаконах («Nunc», Дания) или в пластиковых чашках Петри отечественного производства диаметром 100 мм, предварительно покрытых 0,2 % раствором желатина («Serva», ФРГ). Средой выращивания служила среда MEM с добавленной 10 % эмбриональной сывороткой теленка («Flow», Англия). Лимфоциты или фибробласты инкубировали с 25 % тестируемой сывороткой крови (если не указана другая концентрация) в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе в течение 2 и 5 ч, соответственно. К культуре фибробластов добавляли сыворотку, предварительно профильтровав через стерильный фильтр фирмы «Millipore» (США) с диаметром пор 0,45 мкм.

Количество мест специфического связывания (рецепторов) (1,2,4,6,7 —  $^3\text{H}$ ) — дексаметазона («Amersham», Англия, 70 Сi/ммоль) определяли по методу Скэтчарда [20]. Для определения количества новых мест связывания глюкокортикоидов в лимфоцитах в результате их антигенной стимуляции, выделенные из крови здоровых доноров клетки инкубировали в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе 45 мин с ацетонидом триамсинолона в концентрации 75 нМ, достаточной для насыщения всех связывающих мест. После инкубации лимфоциты дважды от-

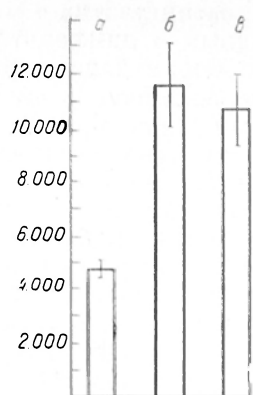


Рис. 1. Количество связывающих мест для дексаметазона в лимфоцитах крови.  
а — контрольная группа (здоровые доноры,  $n=27$ ), б — больные ОИМ ( $n=30$ ), в — лимфоциты доноров после инкубации с сывороткой крови больных ОИМ ( $n=4$ ). По оси ординат — количество связывающих мест на клетку.

мывали от несвязавшегося гормона холодным 0,02 М фосфатным буфером и повторно инкубировали с 25 % сывороткой больного ОИМ в течение 1,5 ч в  $CO_2$ -инкубаторе. После двукратной отмывки фосфатным буфером количество новообразовавшихся мест связывания определяли с меченым дексаметазоном.

Облучение сыворотки крови или раствора человеческого сывороточного альбумина (лишенного жирных кислот; «Sigma», США; 60 мг/мл) ультрафиолетовым светом проводили 15 мин при постоянном перемешивании с использованием бактерицидной лампы БЛФ-12 с длиной световой волны 254 нм. Определение связывания меченого дексаметазона с альбумином проводили по стандартной методике с применением активированного угля (Norit А «Serva», ФРГ). Связывающая способность альбумина не изменялась при его УФ-облучении.

Сердечные антигены, полученные водно-солевой экстракцией интактной и некротизированной тканей миокарда [4], были любезно предоставлены А. Г. Пономаревой (кафедра иммунологии ММСИ им. Н. А. Семашко).

## Результаты и их обсуждение

Как следует из рис. 1, инкубация лимфоцитов здоровых доноров с сывороткой крови больных ОИМ приводила к значительному увеличению числа высокоспецифических связывающих мест (рецепторов) для дексаметазона. Ни аутологичная сыворотка, ни сыво-

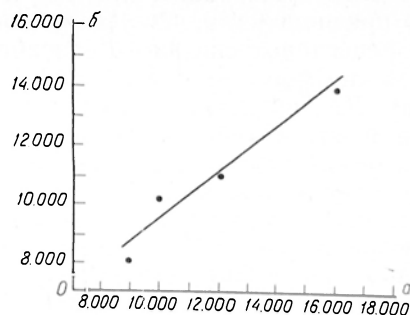


Рис. 2. Зависимость между уровнем глюкокортикоидной рецепции в лимфоцитах больных ОИМ и способностью сыворотки этих больных стимулировать связывание дексаметазона лимфоцитами здоровых доноров.

По оси координат — количество связывающих мест для дексаметазона на клетку в лимфоцитах больных ОИМ (а) и лимфоцитах доноров после инкубации с сывороткой больных ОИМ (б).

ротки крови здоровых доноров с другими группами крови не оказывали подобного эффекта.

Была обнаружена прямая зависимость между уровнем глюкокортикоидных рецепторов в лимфоцитах больных ОИМ и способностью сыворотки этих больных стимулировать связывание дексаметазона лимфоцитами здоровых доноров (рис. 2). Более того, влияние сыворотки больного ОИМ на число клеточных рецепторов к глюкокортикоидам в лимфоцитах здорового донора имело дозозависимый характер: с увеличением концентрации сыворотки в среде инкубации клеток в них увеличивалось количество связывающих мест для дексаметазона (рис. 3). Эти результаты позволили предположить существование фактора в сыворотке больных ОИМ, стимулирующего увеличение числа глюкокортикоидных рецепторов в лимфоцитах. Поскольку известно, что при ОИМ белки из некротического очага приобретают

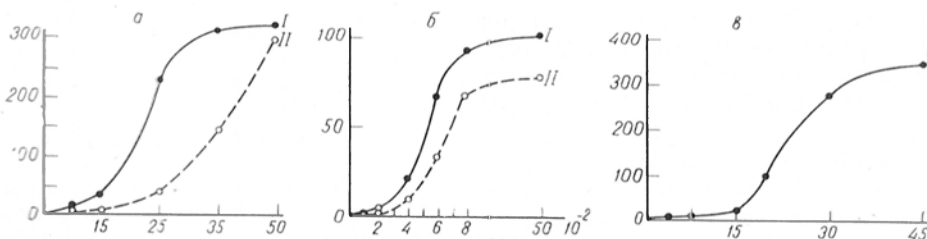


Рис. 3. Увеличение количества глюкокортикоидных рецепторов в лимфоцитах после инкубации с сывороткой больного ОИМ и антигенами различной природы.

а: I — сыворотка больного ОИМ, II — УФ-облученная аутологичная сыворотка; б: I — некротический и II — кардиальный антигены; в: I — УФ-облученный альбумин. По оси абсцисс — мг белка в мл среды инкубации лимфоцитов; по оси ординат — количество рецепторов, в % от контроля.

свойства чужеродных антигенов [9], мы предположили, что увеличение числа рецепторов связано с сенсибилизацией лимфоцитов к сердечному антигену. Для проверки этого предположения изучали действие белковых экстрактов из некротизированного и здорового участков миокарда (сердечные антигены) на уровень рецепторов к глюкокортикоидам в лимфоцитах. Как видно, инкубация лимфоцитов с сердечными антигенами действительно приводила к увеличению в них числа связывающих мест к гормону, причем сердечный антиген из некротизированного участка был более эффективным.

Другим подходом к получению антигенов было УФ-облучение сыворотки крови, при котором происходит образование различных фрагментов белковых молекул, обладающих антигенными свойствами [7]. Инкубация лимфоцитов здорового донора с предварительно облученной УФ аутологичной сывороткой, приводила к увеличению числа связывающих мест для дексаметазона в клетках без изменения константы диссоциации гормон-рецепторного комплекса ( $K_d = 2 \cdot 10^{-9}$  М). Влияние облученной сыворотки на лимфоциты не изменялось, если облучение проводили в вакууме в присутствии антиоксиданта ионола ( $1 \cdot 10^{-5}$  М). Кроме того, сывороточный альбумин человека, облученный УФ светом аналогично сыворотке, также оказывал дозозависимую стимуляцию уровня рецепторов к глюкокортикоидам в лимфоцитах.

Обнаруженный эффект повышения уровня клеточной рецепции к глюкокортикоидам был характерен именно для лимфоцитов. Так, добавление к культуре фибробластов кожи человека (количество связывающих мест  $95\,000 \pm 2000$  на клетку,  $n=7$ ), как сывороток больных ОИМ, так и УФ-облученных сывороток здоровых доноров или альбумина не изменяло количества связывающих мест для дексаметазона в этих клетках ( $95\,200 \pm 1500$ ,  $n=3$ ).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что увеличение количества связывающих мест в лимфоцитах больных ОИМ связано с антигенным действием на клетки белковых компонентов сыворотки. Такой вывод согласуется с данными по увеличению количества связы-

вающих мест для дексаметазона в митоген-стимулированных лимфоцитах [18, 22]. Вместе с тем, в данных работах исследовали связывание дексаметазона с клетками лишь через 24 ч после добавления митогена, объясняя увеличение количества рецепторов их дополнительным синтезом *de novo*. В наших экспериментах мы наблюдали максимальный эффект сывороток больных ОИМ или УФ-облученного альбумина уже через 1,5–3 ч, т. е. в сроки, недостаточные для дополнительного синтеза белка-рецептора [19, 24]. В связи с этим нам представлялось необходимым более строго доказать появление именно новых молекул рецепторов в ответ на антигенную стимуляцию лимфоцитов. Для этого лимфоциты здоровых доноров преинкубировали с синтетическим глюкокортикоидом — триамсинолоном, который, взаимодействуя с рецептором, образует слабодиссоциируемый комплекс [5], т. е. все рецепторы заполнялись меченым триамсинолоном и добавление [ $^3$ H]-дексаметазона не приводило к его связыванию в клетках (рис. 4). Однако если после этого лимфоциты инкубировали с сывороткой больных ОИМ или с облученной сывороткой, то наблюдали появление высокоспецифического связывания [ $^3$ H]-дексаметазона с клетками. Это свидетельствовало об образовании пула новых (незаполненных триамсинолоном) рецепторов. Следует отметить, что новообразовавшиеся рецепторы (около 5 000

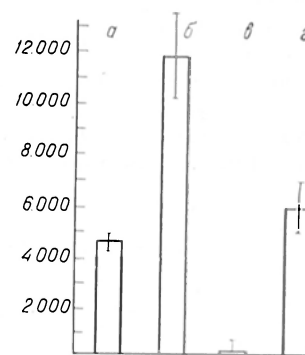


Рис. 4. Определение количества новых мест связывания дексаметазона, появившихся в результате инкубации лимфоцитов с сывороткой больных ОИМ.

а — лимфоциты доноров ( $n=27$ ), б — лимфоциты после инкубации с сывороткой больных ОИМ ( $n=2$ ), в — лимфоциты после инкубации с триамсинолоном ( $n=2$ ), г — лимфоциты после инкубаций с триамсинолоном и сывороткой больных ОИМ ( $n=2$ ). По оси ординат — количество связывающих мест на клетку.

на клетку, см. рис. 4) обладали схожими с исходным пулом рецепторов характеристиками связывания ( $K_d = 2 \cdot 10^{-9}$  М).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что антигенная стимуляция лимфоцитов вызывает увеличение специфического связывания глюкокортикоидных гормонов. Обнаруженные нами изменения в числе рецепторов, видимо, не связаны с функционированием генома клетки, поскольку в этом случае синтез новых белковых молекул происходит в лимфоцитах за 16—24 ч [17]. Быстрое появление новых рецепторных молекул может объясняться использованием уже существующего пула мРНК [16]. Кроме того, объяснение полученному факту можно искать в более тонких механизмах регуляции гормональной рецепции. Как предполагают ряд авторов, глюкокортикоидные рецепторы находятся в клетках-мишенях в двух состояниях: активном и неактивном. Активное состояние рецепторов обеспечивается фосфорилированием самого рецептора или фосфорилированием специфического фактора, находящегося в ассоциации с молекулой рецептора. В свою очередь образование гормон-рецепторного комплекса происходит в результате взаимодействия стероида с активной формой свободного рецептора [24]. Известно, что антигенная стимуляция приводит к быстрому фосфорилированию цитозольных белков в лимфоцитах [13], поэтому обнаруженное нами увеличение числа связывающих мест для глюкокортикоидов, может быть следствием фосфорилирования рецепторов и их перехода из неактивной формы в активную.

Следует отметить, что использование в наших экспериментах клеточной системы, содержащей не только Т- и В-лимфоциты, но и моноциты (5 % от количества клеток), позволяет говорить о сохранении функциональной кооперации клеток иммунной системы и о способности к развитию полноценного иммунного ответа на антигенную стимуляцию [2]. Эксперименты, проведенные с культурой фибробластов кожи человека не выявили изменений в числе глюкокортикоид-связывающих мест по сравнению с контрольными значениями. Это свидетельствует, что обнаруженный эффект увеличения числа связывающих мест в лимфоцитах

характеризуется тканевой специфичностью и является результатом именно антигенной стимуляции клеток иммунной системы.

Известно, что чрезмерно повышенная аутосенсibilизация к миокардиальному антигену при ОИМ сопровождается более тяжелым клиническим течением болезни, в том числе развитием синдрома Дресслера и учащением летальных исходов [4, 6]. В связи с тем, что глюкокортикоиды подавляют функциональную активность лимфоцитов [14], можно предположить, что экспрессия дополнительного числа рецепторов в ответ на антигенную стимуляцию является защитным механизмом, обеспечивающим регуляцию уровня сенсibilизации лимфоцитов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Комисаренко В. П., Минченко А. Г., Тронько Н. Д. Молекулярные механизмы действия стероидных гормонов. — Киев, 1986. — С. 10—31.
2. Кульберг А. Я. Регуляция иммунного ответа. — М., 1986. — С. 5—6.
3. Мухин Н. А., Ляшко В. И., Гринберг К. И. // Тер. арх. — 1987. — № 5. — С. 69—73.
4. Пономарева А. Г., Кулямин В. И., Фомина Л. А. и др. // Кардиология. — 1986. — № 9. — С. 45—48.
5. Розен В. Б., Смирнов А. И. Рецепторы и стероидные гормоны. — М., 1981. — С. 98—99.
6. Ускупюла М. М., Ламп К. М., Мартин С. М. // Кардиология. — 1987. — № 2. — С. 57—60.
7. Холмогоров В. Е., Шурыгин А. Л. // Биофизика. — 1981. — Т. 26, № 3. — С. 44—49.
8. Шартава А. Ш., Петриченко И. Е., Селезнев Ю. А. и др. // Бюл. Всесоюз. кардиол. науч. центра. — 1986. — № 2. — С. 96—100.
9. Щеклик Э., Щеклик А. Инфаркт миокарда. — Варшава, 1974. — С. 106.
10. Böyum A. // Scand. J. clin. lab. Invest. — 1968. — Suppl. — Vol. 97. — P. 77—89.
11. Chrousos G. P., Loriaux D. L., Brandon D. et al. // J. steroid Biochem. — 1983. — Vol. 19, N 1. — P. 567—569.
12. Cidlowski J., Cidlowski N. // Endocrinology. — 1984. — Vol. 110, N 5. — P. 1653—1662.
13. Dasch J. R., Stavitsky A. // Molec. Immunol. — 1985. — Vol. 22, N 4. — P. 379—389.
14. Homo F., Picard F., Durant S. et al. // J. steroid Biochem. — 1980. — Vol. 12. — P. 433—443.
15. Kanazir D. T., Stefanovic D., Mellas R. et al. // Ibid. — 1979. — Vol. 11. — P. 389—400.
16. Kanazir D. T., Ribarac-Stepic N., Djordjevic-Markovic R. D. et al. // Cell Function and Differentiation / Ed. R. Alan. — New York, 1982. — Pt A. — P. 199—205.
17. Lacroix A., Bownard G. P., Lippman M. // J. steroid Biochem. — 1984. — Vol. 21, N 1. — P. 73—80.
18. Munck A., Crabtree G. R., Smith K. A. //

- Glucocorticoid Hormone Action / Eds J. Baxter, G. G. Rousseau. — Berlin, 1979. — P. 341—353.
19. Okret S., Poellinger L., Yu Dong et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1987. — Vol. 83. — P. 5899—5903.
  20. Scatchard G. // Ann. Chem. Soc. — 1949. — Vol. 51. — P. 660—672.
  21. Schlechte J., Ginsberg B., Sherman B. // J. steroid Biochem. — 1982. — Vol. 16, N 1. — P. 69—74.
  22. Smith K. A., Crabtree G. R., Kennedy S. J., Munk A. // Nature. — 1977. — Vol. 267. — P. 523—526.
  23. Svec F. // Life Sci. — 1985. — Vol. 36, N 25. — P. 2359—2366.
  24. Rousseau G. G., Baxter J. D. // Glucocorticoid Hormone Action / Eds J. Baxter, G. G. Rousseau. — Berlin, 1979. — P. 49—77.

Поступила 09.11.87

# ON THE ACTIVATION OF LYMPHOCYTE GLUCOCORTICOID RECEPTORS IN ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION

I. E. Petrichenko, A. Sh. Sharlava, Yu. A. Shakhov

Institute of Preventive Cardiology, All-Union Cardiological Research Centre, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Dose-dependent increase in content of highly specific binding sites for glucocorticoids (receptors), but without alteration in their affinity to the hormone, was observed after incubation during 2 hrs of healthy donor lymphocytes with blood serum of patients with acute myocardial infarction. The similar effects exhibited protein extracts of necrotized and normal parts of human myocardium (heart antigens) as well as the autologous blood serum and human blood serum albumin treated with UV-irradiation. Number of receptors was not altered in human skin fibroblasts incubated both with the patients blood serum and with the UV-treated blood serum. Antigenic effects of protein components, developed in blood serum after acute myocardial infarction, on cells of the lymphoid system appear to be responsible for the increase in number of binding sites for glucocorticoids in lymphocytes of patients with acute myocardial infarction or in lymphocytes of healthy donors incubated with the patients blood serum.

УДК 616-006.04-07:616.153.1:577.152.313]-092

Л. П. Пашинцева, С. О. Гудима, Е. А. Козырева, А. В. Воронов,  
А. А. Миериня, Л. С. Бассалык, Ю. Ю. Венгеров, И. И. Вогрин

## ПЛАЦЕНТАРНАЯ ЩЕЛОЧНАЯ ФОСФАТАЗА — МАРКЕР ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

Всесоюзный онкологический научный центр АМН СССР, Москва; Институт прикладной молекулярной биологии Минздрава СССР, Москва; НИИ медицинской энзимологии АМН СССР, Москва

Исследование общей активности щелочной фосфатазы (ЩФ) и особенно ее изоферментов широко используется при диагностике и наблюдении за течением заболевания у онкологических больных. В последнее десятилетие внимание онкологов привлекли другие изоферменты ЩФ — плацентарный, плацентарноподобный, Нагао, Касахара, обнаруженные как в злокачественных опухолях, так и в сыворотке. В среднем увеличение активности плацентарной ПЩФ (ПЩФ) обнаруживается в сыворотке 5—20 % больных раком. Однако при ряде локализаций злокачественных опухолей частота выявления ПЩФ гораздо выше. Предложено [2, 4, 7] использовать ПЩФ в качестве маркера преимущественно для раннего выявления метастазов и рецидивов рака яичников и яичка, а также для наблюдения за эффективностью лечения. Иммуноферментные

методы, широко используемые в настоящее время, благодаря высокой чувствительности и специфичности обладают значительными преимуществами по сравнению с применявшимися ранее. В связи с этим разработка и внедрение отечественного иммуноферментного метода определения ПЩФ являются чрезвычайно важными. В данном исследовании приведены результаты оценки чувствительности, специфичности и значимости определения ПЩФ в качестве маркера рака с помощью разработанного нами иммуноферментного метода.

### Методика

Активность ПЩФ в сыворотке определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Антитела, специфичные к ПЩФ, очищали биоспецифической хроматографией на агарозе с иммобилизацией ПЩФ. В качестве стандарта как при иммунизации,