

Архив журнала

Вопросы медицинской химии

ISSN 0042-8809

1992

Том 38 выпуск 3

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

Archive of journal

Voprosy meditsinskoi khimii

ISSN 0042-8809

1992

Volume 38 issue 3

Attention! OCR has been performed automatically for search engines only. Be careful when copying, errors are possible. Use scanned picture as standard.

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

нарушению регуляции активности фосфолипаз и, следовательно, активации липолиза и снижению содержания жирных кислот в фосфолипидах мембран [2]. Освободившиеся жирные кислоты могут использоваться как источник энергии посредством их β -окисления, что в свою очередь приводит к снижению их содержания.

Таким образом, черепно-мозговая травма приводит к существенным изменениям содержания жирных кислот в нервной ткани, что может быть одним из важнейших звеньев патологического процесса травматической болезни в остром и отдаленном ее периоде.

ЛИТЕРАТУРА

1. Антонов В. Ф. Липиды и ионная проницаемость мембран. — М., 1982. — С. 50—80.
2. Бондарь О. И., Матышевская О. П., Остапченко Л. И., Васильев А. П. // Бюл. экпер. биол. — 1988. — № 6. — С. 24—25.
3. Бурлакова Е. Б. // Биохимия липидов и их роль в обмене веществ. — М., 1981. — С. 23—34.
4. Гельфанд В. Б., Маламуд М. Д., Истратов В. Г. Закрытая черепно-мозговая травма. — Кишинев, 1986. — С. 163—166.
5. Казан В. Е., Тюрин В. А., Горбунов Н. В. и др. // Журн. эволюц. биохим. — 1984. — № 1. — С. 9—15.
6. Копьев О. В. Ультраструктурный и ультрацитохимический анализ экспериментального сотрясения мозга: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — Киев, 1988.
7. Ньюсхолм Э., Старт К. Регуляция метаболизма. — М., 1977.
8. Промыслов М. III. Обмен веществ в мозге и его регуляции при черепно-мозговой травме. — М., 1984.
9. Ромоданов А. П., Копьев О. В. // Вестн. АМН СССР. — 1984. — № 12. — С. 19—25.
10. Ромоданов А. П., Тушевский В. Ф., Копьев О. В. // Вопр. нейрохир. — 1987. — № 3. — С. 16—24.
11. Синяк К. М., Оргель М. Я., Крук В. И. // Лаб. дело. — 1976. — № 1. — С. 37—41.
12. Терновой В. А., Яковлев В. М. // Вопр. мед. химии. — 1989. — № 5. — С. 58—61.
13. Fatty Acid Metabolism and its Regulation / Ed. S. Numa. — New York, 1984. — P. 209.

Поступила 07.02.91

ALTERATIONS IN CONTENT OF FATTY ACIDS IN RABBIT BRAIN HEMISPHERES IN DYNAMICS OF EXPERIMENTAL BRAIN CONCUSSION

V. P. Parkhometz, N. G. Chopik, I. G. Vasilyeva

Institute of Neurosurgery, Ministry of Public Health of the Ukrainian SSR, Kiev.

Content of fatty acids in rabbit brain hemispheres in dynamics of experimental brain concussion was estimated by means of gas liquid chromatography. Content of fatty acids was increased within 15 min after experimental brain concussion and then it decreased reaching minimal values within 7 days. The phenomenon observed is a pathogenetically important factor in the traumatic disease.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1992

УДК 616.155.33/34-018.1:576.314:577.352.33

А. Г. Глоба, Н. В. Зайцева, В. Г. Тепляков, А. А. Карелин

ОБРАЗОВАНИЕ ПЛАЗМАМЕМБРАННОГО СИГНАЛЬНОГО АТФ АКТИВИРОВАННЫМИ НЕЙТРОФИЛАМИ И МАКРОФАГАМИ: СВЯЗЬ С ПРОДУКЦИЕЙ СУПЕРОКСИДА И СОСТОЯНИЕМ РЕЦЕПТОРОВ К ФОРМИЛПЕПТИДАМ

Институт хирургии им. А. В. Вишневского АМН СССР, Москва

Известно, что нейтрофилы под действием различных активаторов способны производить супероксидные радикалы, которые участвуют в киллинге и разрушении микроорганизмов [14]. Активации нейтрофилов предшествует ряд событий на их плазматических мембранах. Хемоаттрактант формилпептид N-формил-L-метионил-L-лейцил-L-фенилаланин (ФМЛФ), связываясь со своими специфическими рецепторами на поверхности нейтрофилов, инициирует транспорт ионов [25] и активирует процессы фосфорилирования ключевых регуляторных белков мембраны [12]. Одним из конечных событий этого процесса является активация супероксидгенирирующей NADPH-оксидазы посредством ее фосфорилирования. Эта реакция протекает с участием фосфолипид- и Ca^{2+} -зависимой протеинкиназы C и АТФ [27]. Таким образом, АТФ оказывается необходимым компонентом для целой серии каскадных биохимических реакций, приводящих к активации нейтрофилов. Ранее нами сообщалось о способности плазматических мембран нейтрофилов синтезировать транзитный АТФ под действием ФМЛФ [5]. По нашим предположениям, этот плазматический АТФ играет роль передатчика гормонального сигнала [1—6].

При различных видах хирургической инфекции наблюдается подавление как миграционной, так и фагоцитарной функции нейтрофилов [9], однако причины этого еще не выявлены. При исследовании препаратов, обогащенных плазматическими мембранами частиц (ОПМЧ) нейтрофилов, взятых у больных с раневой инфекцией, мы выявили угнетение синтеза плазматического АТФ, что коррелировало с тяжестью протекания инфекционного процесса [5]. Настоящее исследование проведено с целью выяснения роли плазматического АТФ в передаче сигнала к активации нейтрофилов.

Методика. Использованные реактивы: аденозин-5'-дифосфата натриевая соль, NAD, NADH («Reanal», Венгрия), D, L- β -оксимасляной кислоты натриевая соль («Loba Chemie», Австрия), d-глюкоза, ротенон (BDH, Англия), NADP, глицил-глицин, трис-оксиметиламинометан, бычий сывороточный альбумин (фракция V), цитохром с из сердца лошади, аптимин А, нафталин, смола Дауэкс 1×8 (100—200 мн), HEPES («Serva», Германия), гексокиназа (КФ 2.7.1.1), дифенил-оксазол («Fluka», Швейцария), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (КФ 1.1.49), супероксиддисмутаза («Boehringer», Германия), ФМЛФ, 5'-фторсульфонилбензоил-аденозин, фенилметилсульфонил-фторид («Calbiochem-Boehringer Corp.», США), ^3H -ФМЛФ, удельная радиоактивность 2086,2 ГБк/ммоль (NEN, Англия), ^{14}C -АТФ, удельная радиоактивность 17,02 ГБк/ммоль (V, Чехо-Словакия), фиколл-400 («Pharmacia», Швеция), верографин («Spofa» Чехо-Словакия), дифенилоксазолилбензол, сахароза, NaCl, KH_2PO_4 ,

ЭДТА, $MgCl_2$, $MgSO_4$, этанол, KCl («Союзхимреактив», квалификация не ниже х. ч.), желатин медицинский 10 % («Медфармпрепараты», СССР).

Выделение нейтрофилов из периферической крови крысы. 5 мл крови крысы + 1 мл 1,8 % трилона Б помещали в пробирку объемом 20 мл, содержащую 10 мл 3 % желатина в физиологическом растворе. После отстаивания в термостате в наклонном положении надэритроцитарный слой жидкости помещали на двухступенчатый градиент и центрифугировали при 200 g при комнатной температуре в течение 30 мин. Состав градиента: внизу 2 мл смеси равных объемов 36 % верографина и градиента фикола — верографин ($\rho = 1,107 \text{ г/см}^3$), сверху 2 мл градиента фикола — верографин ($\rho = 1,107 \text{ г/см}^3$). После центрифугирования нейтрофилы с примесью эритроцитов располагались кольцом на границе между слоями градиента. Нейтрофилы отделяли и однократно промывали физиологическим раствором, осаждая клетки центрифугированием (400 g, 10 мин). От примеси эритроцитов избавлялись осмотическим шоком (8 мл дистиллированной воды; через 1 мин добавляли 4 мл 3-кратного физиологического раствора для восстановления изотоничности). Затем нейтрофилы отмывали от продуктов гемолиза буфером для инкубации (128 мМ NaCl, 1,4 мМ $CaCl_2$, 5,2 KCl, 5,6 мМ D-глюкоза 10 мМ HEPES, pH доводили до 7,4 при помощи 1 М КОН), осаждая клетки центрифугированием (400 g \times 10 мин). Полученный осадок нейтрофилов суспендировали в том же буфере и количество клеток подсчитывали в камере Горяева. Чистоту популяции контролировали с использованием бензидиновой пробы на миелопероксидазу. Количество нейтрофилов составляло 96 % от общего числа клеток. В суспензиях нейтрофилов, использованных в опытах, содержалось $1 \cdot 10^6$ клеток на 1 см^3 .

Выделение макрофагов из перитонеальной жидкости морской свинки проводили, как описано ранее [33], с нашими модификациями. 10—15 морским свинкам-самцам массой 250—350 г вводили внутривентрально по 25 мл 1 % раствора крахмала на физиологическом растворе. Через 3 сут животных, получивших эфирный раушный наркоз, декапитировали и промывали брюшную полость физиологическим раствором, содержащим 10 ЕД/мл гепарина. Полученный экссудат центрифугировали (400 g, 15 мин при $4-5^\circ\text{C}$). Осадок макрофагов однократно промывали физиологическим раствором в тех же условиях. Количество макрофагов в популяции составляло 80—90 %.

Получение ОПМЧ из нейтрофилов и макрофагов проводили, как описано ранее [36], с нашими модификациями. Клетки ($10 \cdot 10^6$) суспендировали в 10 мл 0,01 М трис-HCl-буфера pH 7,4, содержащего 1 мМ PMSF, и разрушали в гомогенизаторе Даунса многократными ударами пестика (50 ударов). Ядра и неразрушенные клетки осаждали центрифугированием (400 g, 10 мин), а ОПМЧ однократно промывали 0,01 М трис-HCl-буфером pH 7,4 с последующим центрифугированием (20 000 g, 30 мин), плазматические мембраны ресуспендировали в 0,25 М сахарозе. Обогащение фракции плазматическими мембранами контролировали по маркеру 5'-нуклеотидазе. Активность 5'-нуклеотидазы в наших препаратах увеличивалась в 6,2 раза в ОПМЧ нейтрофилов крыс и 5,2 раза в ОПМЧ перитонеальных макрофагов морских свинок по отношению к исходным гомогенатам. Содержание белка в препаратах определяли по Лоури [26]. В суспензиях ОПМЧ, использованных для инкубаций, концентрация белка составляла 0,8—1,2 мг/мл (макрофаги) и 0,4—0,6 мг/мл (нейтрофилы).

Инкубация, остановка реакции, выделение мембранно-связанного АТФ осуществлялись, как описано ранее [1—6].

Продукцию супероксида (СО) нейтрофилами крысы измеряли так же, как и в наших предыдущих исследованиях [7].

Исследование связывания ФМЛФ с рецепторами нейтрофилов крысы. В полипропиленовые пробирки (15 \times 40 мм), содержащие 25 мкл инкубационного буфера или 25 мкл раствора ФМЛФ, обеспечивающего конечную концентрацию 100 мкМ (эти образцы использовали для контроля неспецифической сорбции), помещали 25 мкл раствора ^3H -ФМЛФ (1—50 пМ конечной концентрации) и 100 мкл суспензии нейтрофилов в инкубационном буфере ($1 \cdot 10^6$ мкг/мл). Инкубировали без встряхивания при 22°C в течение 1 ч. По окончании инкубации пробирки помещали в центрифугу «Janetzky» (K-23) и нейтрофилы осаждали при 4000 об/мин в течение 20 мин при 0°C . Надосадочную жидкость отсасывали иглой, соединенной с водоструйным насосом. Осадок промывали однократно 1 мл холодного (4°C) инкубационного буфера (4000 об/мин, 20 мин, 0°C) и дважды 2 мл охлажденного 96 % этанола в тех же условиях. После промывки этанолом

пробирку с нейтрофилами, зафиксированными на дне, помещали в стандартные флаконы для счетчика LS-4000 (Франция), заливали 4,5 мл диоксанового сцинтиллятора и оставляли на 1 сут при комнатной температуре. Через 1 сут образцы просчитывали (в двух параллелях) на жидкостном сцинтилляционном счетчике SL-4000 в тритиевом канале. Эффективность счета составляла 20 %.

Связывание формилпептида определяли по разности между экспериментальными образцами, содержащими меченный по тритию ФМЛФ, и образцами, содержащими избыток «холодного» формилпептида. Параметры связывания определяли методом Скетчерда, как описано в руководстве [11]. Для проверки корректности нашей методики мы исследовали связывание формилпептида с нейтрофилами человека (доноров). Параметры комплексообразования для человеческих нейтрофилов, полученные по нашей методике, соответствовали данным зарубежных авторов [23, 35].

Инфекционный процесс вызывали у крыс-самцов линии Вистар массой 180—200 г путем однократного внутримышечного введения 0,3 мл взвеси суточной культуры *Pseudomonas aeruginosa*, штамм № 453, содержащий $8 \cdot 10^9$ микробных тел в 1 мл 10 % раствора $CaCl_2$. Штамм был получен из музея культур Института стандартизации и контроля медицинских и биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича.

Результаты и обсуждение. Процесс развития бактериального заражения в наших опытах происходил по типу септикопиемии. Одновременное введение дозы микроорганизмов и раствора $CaCl_2$ вызвало инфицированный некроз ткани и угнетение репаративной реакции, в результате чего в течение 1—3 сут возникали местный гнойный очаг и поверхностная язва. Генерализация инфекционного процесса сопровождалась развитием во внутренних органах (главным образом в почках) вторичных пиемических очагов у 85 % погибших в период 3—14 сут животных. Летальность у крыс линии Вистар массой 180—200 г за этот период составила 70 %. Пиемические очаги размером 0,1—0,3 мм отмечали на вскрытии у погибших животных уже через 3 сут после инфицирования и достигали к 14-м суткам размеров 3—7 мм. В начальной стадии септикопиемии (3-и сутки) отмечали резкое повышение ФМЛФ-стимулированной продукции СО нейтрофилами; на более поздних сроках продукция СО постепенно снижалась, оставаясь, однако, выше нормы (табл. 1).

Ранее, исследуя нейтрофилы больных с ожогами, мы выявили, что продукция СО, вызываемая

Таблица 1

Продукция СО (в нмоль/ 10^6 клеток за 30 мин) нейтрофилами крыс, зараженных *Pm. aeruginosa*

Условия опытов	Неактивированные нейтрофилы	Активированные ФМЛФ нейтрофилы	Стимулирующий эффект ФМЛФ, нмоль СО/ 10^6 клеток за 30 мин (А СО)
Контроль (интактные крысы)	$1,23 \pm 0,17$ (31)	$2,60 \pm 0,31$ $<0,001$	1,37
После инфицирования, сут:			
3	$3,92 \pm 0,74$ (6)	$7,61 \pm 1,12$ $<0,01$	3,69
6	$2,13 \pm 0,32$ (6)	$5,16 \pm 0,85$ $<0,01$	3,03
15	$1,63 \pm 0,24$ (6)	$3,37 \pm 0,50$ $<0,01$	1,74

Примечание. Здесь и в табл. 3 в скобках — число опытов.

Таблица 2

Параметры связывания формилпептида с рецепторами нейтрофилов крыс, инфицированных *Ps. aeruginosa*

Условия опытов	Константа диссоциации лиганд-рецепторного комплекса, нМ	Число рецепторов ФМЛФ, тыс. на 1 клетку
Контроль (интактные крысы)	40,5	104,8
После инфицирования, сут:		
3	42,5	44,6
6	42,5	30,7
15	43,0	18,7

Примечание. Параметры связывания определены по средним значениям 3 независимых друг от друга экспериментов. В каждом эксперименте были объединены нейтрофилы от 6 животных. Каждую пробу исследовали в 2 параллельных экспериментах.

стимуляцией формилпептидом, является достаточно эффективным критерием иммунных сил организма, позволяющим прогнозировать течение ожоговой болезни. Так, резкое снижение этого показателя свидетельствует о наличии у больного очагов некроза и угрозе возникновения сепсиса [7]. На ранних же стадиях ожоговой болезни (ожоговый шок), а также при инфицировании и других стрессах обнаружено повышение активности NADPH-оксидазы в нейтрофилах больных [17, 20]. Наблюдаемое нами повышение продукции СО, вероятно, также является следствием активации нейтрофильной NADPH-оксидазы. Различные стрессовые факторы способны модулировать иммунный ответ нейтрофилов, причем в такой модуляции участвуют энкефалины и эндорфины [29]. В частности, у больных при инфаркте миокарда нейтрофилы гиперактивны в отношении продукции кислородных радикалов [8]. Состояние нейтрофильных рецепторов, чувствительных к формилпептиду, может обуславливать наблюдаемое нами постепенное снижение продукции СО по мере развития септикотоксического процесса. Методом анализа по Скетчерду мы установили, что нейтрофилы здоровых крыс в норме имеют 104,8 тыс. формилпептидных рецепторов на 1 клетку со сравнительно низкой активностью ($K_d=40,5$ нМ). При инфицировании крыс количество нейтрофильных рецепторов резко уменьшалось (до 44,6 тыс. на 1 клетку), причем их аффинность практически не изменялась (табл. 2). Дальнейшее уменьшение числа рецепторов, наблюдаемое на 6-е и 15-е сутки после инфицирования, коррелировало со снижением продукции СО. При некоторых патологических состояниях снижение числа нейтрофильных рецепторов сопровождается дефектом подвижности нейтрофилов, что способствует различным осложнениям в виде воспалительных процессов. В частности, у больных при локальном ювенильном перитоните число нейтрофильных рецепторов снижено без изменения их аффинности [35]. В наших экспериментах резкое снижение числа рецепторов в нейтрофилах является следствием развившейся у животных септикопиемии. Существует множество факторов, изменяющих состояние формилпептидных рецепторов. Так, дефицит ионов Na^+ вызывает повышение их аффинности [36], избыток

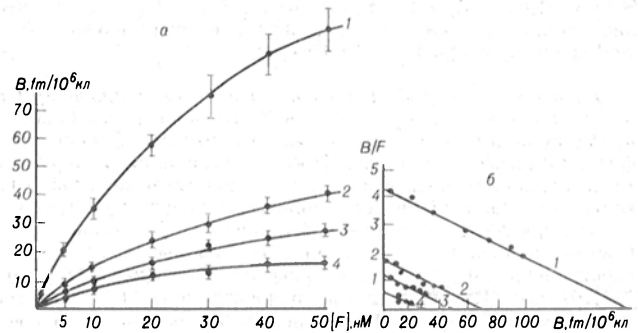


Рис. 1. Связывание ФМЛФ с рецепторами нейтрофилов у контрольных и инфицированных крыс.

1 — контроль; 2, 3, 4 — соответственно 3, 4 и 15-е сутки после инфицирования. а — прямые координаты, б — график Скетчерда. F — свободный пептид; B — связанный пептид.

повышает долю высокоаффинных центров, а гуаниловые нуклеотиды ингибируют связывание формилпептида с рецепторами [32]. Показано, что формилпептидные рецепторы существуют в 2 аффинных состояниях, что опосредует соответственно хемотаксис и фагоцитоз [23]. В наших экспериментах линейный характер графиков Скетчерда показывает, что на всех стадиях септикопиемии на поверхности нейтрофилов крысы ФМЛФ-связывающие центры находятся в одном аффинном состоянии (рис. 1). На основании наших исследований невозможно определить, какой из факторов вызывает снижение числа мест связывания для ФМЛФ. Нами установлено, что, несмотря на дефект лиганд-рецепторного взаимодействия, продукция СО в начале септикопиемии резко возрастает. Это явление может обуславливаться независимой от гормон-рецепторного взаимодействия активацией протеинкиназы С и как следствие усилением фосфорилирования ключевых регуляторных белков и NADPH-оксидазы. Остается открытым вопрос о целесообразности высокой супероксидгенерирующей активности нейтрофилов. При ревматоидном артрите и остеоартрите избыток продукции СО может вызвать деструкцию тканей [15]. Гиперчувствительность нейтрофилов по отношению к формилпептидам может вызвать синдром дыхательной недостаточ-

Таблица 3

Изменение АТФ-образующей активности (в нмоль/мг белка за 1 мин) ОПМЧ нейтрофилов крыс, зараженных *Ps. aeruginosa*

Условия опытов	Количество образовавшегося АТФ		Стимулирующий эффект ФМЛФ, Δ АТФ, нмоль/мг белка за 1 мин
	без ФМЛФ	+ФМЛФ	
Контроль (интактные крысы) p	1,05±0,16 (6)	2,43±0,43 <0,05	1,38
После инфицирования, сут:			
3 p	1,17±0,06 (6)	7,11±0,10 <0,01	5,94
6 p	1,41±0,03 (6)	5,98±0,18 <0,01	4,57
15 p	1,33±0,06 (6)	3,62±0,35 <0,05	2,23

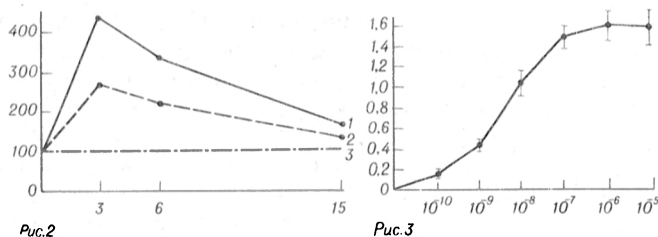


Рис. 2. Связь образования плазматического АТФ с продукцией СО нейтрофилами инфицированных крыс.

По оси абсцисс — время, сут; по оси ординат — % от нормы. 1 — АТФ-продукция мембранно-связанного АТФ; 2 — АСО-продукция супероксида; 3 — норма (100 % — контроль).



Рис. 3. Зависимость образования плазматического сигнального АТФ перитонеальными макрофагами морской свинки от концентрации ФМЛФ.

По оси абсцисс — концентрация ФМЛФ, М; по оси ординат — АТФ, нмоль/мг белка. Приведены средние результаты 4 независимых друг от друга экспериментов (по 4 параллельных пробы) на каждую концентрацию ФМЛФ.

ности при эндотоксемии [28]. Плазматический сигнальный АТФ в наших экспериментах активно синтезировался препаратами ОПМЧ нейтрофилов, полученных от инфицированных животных. Максимум образования АТФ наблюдался на 3-и сутки инфекционного процесса; в дальнейшем образование АТФ несколько уменьшалось (табл. 3). Аналогично изменялась продукция СО (рис. 2).

Результаты наших экспериментов позволяют предположить, что плазматический АТФ наряду с ролью усилителя сигнала к активации нейтрофилов может играть роль компенсатора патологических изменений.

Классическая схема активации нейтрофила, принятая в настоящее время, включает в себя множество промежуточных реакций: сопряжение гормон-рецепторного комплекса с нейтрофильным G_{12} -белком, связывание ГТФ с α -субъединицей G_N -белка, которая затем отщепляется от β -, γ -субъединиц G -белка и активирует фосфолипазу С. Далее следует гидролиз фосфолипазой С полифосфатов фосфатидилинозитола с образованием 2 вторых мессенджеров: инозитол-1,4,5-трифосфата и диацилглицерола (ДАГ), и только после всех этих событий, не требующих АТФ, происходит миграция из цитозоля и активация Ca^{2+} - и фосфолипидзависимой протеинкиназы С [33]. Далее начинается АТФ-зависимый этап, связанный с фосфорилированием ключевых регуляторных белков и NADPH-оксидазы, приводящей к активации этого фермента и продукции СО [16, 34]. Это АТФ-зависимое фосфорилирование осуществляется преимущественно протеинкиназой С, поступающей из цитозольного слоя, и активированной ДАГ. Возможно, в нем принимают участие и другие, еще не идентифицированные протеинкиназы. Непонятна роль обнаруженной на нейтрофилах эктопротеинкиназы, утилизирующей АТФ из наружной среды [37]. По данным [24], АТФ при действии на интактные нейтрофилы в концентрации 0,1–20 мМ усиливает стимулированную ФМЛФ генерацию СО, что сопровождается укорочением лаг-периода в реакции нейтрофилов на ФМЛФ, а также вызывает скоротечное повышение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , подготавливая нейтрофил к усиленной генерации СО. Время, прошедшее от момента связывания

формилпептида со своим рецептором до начала ответа в виде продукции СО (лаг-период), составляет 32–42 с [22]. В то же время (к 45 с) отмечался максимум накопления мембранно-связанного АТФ [7]. Поэтому не исключена возможность, что протеинкиназа С, выходя из цитозольного слоя, использует этот плазматический АТФ для активации NADPH-оксидазы, фосфорилируя ее. Возможно, что благодаря микрокомпартиментализации плазматической мембраны [10] АТФ, находящийся в высокой концентрации в цитозольном слое, не может проникнуть к своим мембранно-связанным «потребителям» и они «вынуждены» использовать тот АТФ, который транзитивно возникает на мембране из АДФ и неорганического фосфата, используя энергию ионных градиентов. Наши предварительные эксперименты, проведенные с плазматическими мембранами эритроцитов, показали, что синтез плазматического АТФ связан, скорее всего, с работой Na^+H^+ -обменников и, по-видимому, здесь используется энергия натриевого градиента, а транспорт протонов играет роль активатора этого процесса. Таким образом, синтез плазматического АТФ представляет собой протонактивируемое, натрийтранспортирующее фосфорилирование [21]. Обнаружена активация Na^+H^+ -обмена в нейтрофилах под действием формилпептида [22, 25], что дает возможность предположить, что универсальный механизм синтеза плазматического АТФ действует и в нейтрофилах. Термин «активация» отнесен нами только к продукции СО. Функциональный ответ на действие формилпептидов весьма разносторонен и включает в себя хемотаксис, дегрануляцию с выбросом лизосомальных ферментов, образование псевдоподий, агрегацию и хемотаксис, т. е. направленное движение по градиенту концентрации стимула, наблюдаемое для нейтрофилов при низких концентрациях ФМЛФ [18]. Механизмы, лежащие в основе направленных миграций эукариотических клеток и клеточного роста, принципиально сходны [31]. Возможно, что плазматический сигнальный АТФ, генерируемый внешней мембраной живой клетки в ответ на опосредуемый рецептором пептидный стимул, закономерно возникает при действии как многих полипептидных факторов роста и стимуляции клеточной дифференцировки или митогенеза, так и стимуляторов хемотаксиса [1–6]. По-видимому, этот тип АТФ инициирует активацию специфического фосфорилирования на плазматической мембране в процессе трансдукции сигнала к росту, клеточным пролиферациям и хемотаксису.

Установлено [19], что протеинкиназа С участвует в передаче сигнала к хемотаксису. Нами установлено влияние ФМЛФ на синтез плазматического сигнального АТФ в перитонеальных нейтрофилах морской свинки. Исследованы хемотаксические и фагоцитарные концентрации стимула. Известно, что концентрация ФМЛФ, вызывающая хемотаксис у 50 % нейтрофилов кролика (ED_{50}), составляет $7\text{--}10^{11}$ М, а концентрация, индуцирующая выброс лизосома у половины клеток, — $2,5\text{--}10^{10}$ М [18]. Полученные нами результаты (рис. 3) свидетельствуют о том, что максимальная продукция «сигнального» АТФ наблюдается при «фагоцитарных» концентрациях формилпептида, но эффект синтеза плазматического

ного АТФ весьма слаб и проявляется и при хемотаксических концентрациях стимула. Таким образом, нельзя заключить, что плазмамембранный АТФ участвует в развитии какого-либо одного функционального ответа нейтрофилов. Скорее всего он опосредует активацию клетки вообще, если понимать активацию как выведение клетки из состояния покоя. Мы использовали $2,5 \times 10^{-5}$ М концентрацию ФМЛФ, которая должна была обеспечить не только полную оккупацию всех рецепторов на интактных нейтрофилах, но и связь с рецепторами препаратов плазматических мембран, аффинность которых могла быть снижена в процессе их выделения.

Эта же концентрация формилпептида была нами использована и в опытах с перитонеальными макрофагами — иммуокомпетентным типом клеток, также обладающих рецепторами к формилпептиду и способностью к хемотаксису и фагоцитозу [33]. Как выяснилось, эти клетки также синтезируют плазмамембранный АТФ в ответ на действие формилпептида, причем по своей АТФ-генерирующей активности они превосходят все ранее изученные нами клетки. Выделенные из них препараты ОПМЧ под действием ФМЛФ накапливали $40,9 \pm 4,6$ нМ/мг белка АТФ за 1 мин инкубации; контрольные образцы содержали 12,8 нМ/мг белка АТФ.

Столь высокая АТФ-образующая активность может объясняться тем, что макрофаги в отличие от нейтрофилов чрезвычайно зависят от процессов аэробного, антимициннечувствительного фосфорилирования. В макрофагах, по-видимому, большое количество синтезированного плазмамембранного АТФ депонируется и частично снабжает клетку энергией, поэтому макрофаги хорошо функционируют только в аэробной среде [30].

Таким образом, обнаруженный нами плазмамембранный сигнальный АТФ может являться необходимым компонентом начальных стадий активации иммуокомпетентных клеток (нейтрофилов и макрофагов) как в норме, так и при патологических состояниях. Мы полагаем, что основные АТФ-генерирующие системы клетки (окислительное фосфорилирование в митохондриях и гликолитическое субстратное фосфорилирование) снабжают клетку-мишень энергией АТФ на более поздней стадии действия гормона.

ЛИТЕРАТУРА

1. Карелин А. А. // *Вопр. мед. химии.*— 1981.— № 5.— С. 679—685.
2. Карелин А. А. // *Вестн. АМН СССР.*— 1983.— № 7.— С. 74—75.
3. Карелин А. А., Глоба А. Г., Демидова В. С. и др. // *Вопр. мед. химии.*— 1985.— № 2.— С. 111—117.
4. Карелин А. А. // *Вестн. АМН СССР.*— 1986.— № 8.— С. 77—90.
5. Карелин А. А., Глоба А. Г., Демидова В. С., и др. // *Вопр. мед. химии.*— 1986.— № 5.— С. 93—97.
6. Карелин А. А. // *Вестн. АМН СССР.*— 1987.— № 7.— С. 35—41.
7. Карелин А. А., Алексеев А. А., Глоба А. Г. и др. // *Вопр. мед. химии.*— 1988.— № 5.— С. 107—110.
8. Клебанов Г. И., Туркменова Э. М., Крейнина М. В. и др. // *Биол. мембраны.*— 1987.— № 10.— С. 1084—1092.
9. Кузин М. И., Белоцкий С. М., Карлов В. А. // *Раны и раневая инфекция.*— М., 1981.— С. 221.
10. Любарев А. Е., Курганов Б. И. // *Успехи соврем. биол.*— 1989.— Т. 108, № 1 (4).— С. 19—35.

11. Ткачук В. А. // *Введение в молекулярную эндокринологию.*— М., 1983.— С. 256.
12. Andrews P. S., Babior B. M. // *Blood.*— 1984.— Vol. 64.— P. 883—890.
13. Babior B. M. // *New Engl. J. Med.*— 1978.— Vol. 298.— P. 659—668.
14. Badwey J. A., Karnovsky M. L. // *J. biol. Chem.*— 1979.— Vol. 254.— P. 11530—11537.
15. Biemond P., Swaak A. J., Penders J. M. A. et al. // *Ann. rheum. Dis.*— 1986.— Vol. 45, N 3.— P. 249—255.
16. Clark R. A., Leidal K. G., Ingraham L. M., Nauseef W. M. // *Europ. J. clin. Invest.*— 1987.— Vol. 17, N 2.— Pt 2.— P. 60.
17. Disenbery K. E., Mendikla J. R., Skubitz K. M. // *Biochem. biophys. Res. Commun.*— 1988.— Vol. 153, N 1.— P. 7—13.
18. Elmer L. B. // *Amer. J. Path.*— 1987.— Vol. 129, N 1.— P. 16—24.
19. Harvath L., McCall Ch. E., Bass D. A., McPhail L. C. // *J. Immunol.*— 1987.— Vol. 139, N 9.— P. 3055—3061.
20. Heck E. L., Edgar E. A., Masters B. S., Baxtey C. R. // *J. Trauma.*— 1979.— Vol. 19.— P. 49—51.
21. Karelin A. A., Globa A. G., Demidova V. S. // *Federation of European Biochemical Societies, Meeting, 19th: Abstracts.*— Rome, 1989.— P. TU 391.
22. Korchak H. M., Weissmann G. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.*— 1978.— Vol. 75.— P. 3818—3822.
23. Koo C., Lefkowitz R. J., Snyderman R. // *Biochem. biophys. Res. Commun.*— 1982.— Vol. 106, N 2.— P. 442—449.
24. Kuhus D. B., Wright D. J., Nath J. et al. // *Lab. Invest.*— 1988.— Vol. 58, N 4.— P. 448—453.
25. Louis S. // *J. biol. Chem.*— 1985.— Vol. 64.— P. 883—890.
26. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // *Ibid.*— 1951.— Vol. 193.— P. 265—275.
27. Nishihira I., McPhail L. C., O'Flaherty I. T. // *Biochem. biophys. Res. Commun.*— 1986.— Vol. 134, N 2.— P. 587—594.
28. Olsen U. B., Bille-Hansen V. // *Agents Actions.*— 1987.— Vol. 21, N 1—2.— P. 177—183.
29. Palmblad J. E. W. // *Cancer Detect. Prev.*— 1987.— Suppl. 1.— P. 57—64.
30. Reis M., Dirk R. // *J. clin. Invest.*— 1978.— Vol. 61.— P. 480—488.
31. Singer S. J., Kufer A. // *Ann. Rev. Cell. Biol.*— 1986.— Vol. 2.— P. 337—365.
32. Snyderman R. // *Fed. Proc.*— 1984.— Vol. 43, N 12.— P. 2743—2748.
33. Snyderman R., Fudman P. // *J. Immunol.*— 1980.— Vol. 124.— P. 2754—2757.
34. Tauber A. I. // *Blood.*— 1987.— Vol. 69, N 3.— P. 711—720.
35. Van Dyke T. E. // *Rev. infect. Dis.*— 1985.— Vol. 7, N 3.— P. 419—425.
36. Zigmond S. H., Woodwarth A., Daukas G. // *J. Immunol.*— 1985.— Vol. 135, N 1.— P. 531—536.
37. Zinsde S. M., Gothoskar B. P. // *FEBS Lett.*— 1982.— Vol. 139.— P. 317—320.

Поступила 03.05.90

FORMATION OF PLASMA MEMBRANE SIGNAL ATP WITH ACTIVATED NEUTROPHILS AND MACROPHAGES: RELATIONSHIP BETWEEN SUPEROXIDE PRODUCTION AND THE STATE OF FORMYL-PEPTIDE RECEPTORS

A. G. Globa, N. V. Zaitseva, V. G. Teplyakov, A. A. Karelin
A. V. Vishnevsky Institute of Surgery, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Formation of plasmatic membrane signal ATR in target cells containing growth peptide factors have been found in various mammalian tissues including neutrophils activated by formyl-peptide. Maximal development of the plasmatic membrane ATP was observed within 3 days in neutrophils of rats with septicopyemia. Production of superoxide anion in neutrophils of these rats was the highest also within 3 days and constituted 3.7 nmol/mg of protein as compared with 1.4 nmol/mg in controls; within the subsequent periods dynamics of the superoxide anion content correlated with the rate of plasmatic membrane signal ATP synthesis. The state of receptors to formyl-peptide was altered as follows: content of their binding sites in neutrophils was distinctly decreased at the beginning of septicopyemia and continued to decrease within later periods but the receptors affinity was not altered. Thus, production of

superoxide anion was not related directly to amount of receptors to formyl-peptide while it correlated with formation of the plasmatic membrane signal ATP. The phenomenon of the signal ATP synthesis in neutrophils occurred mainly at concentrations of formyl-peptide activating phagocytosis. Other immunocompetent cells-macrophages produced also the plasmatic membrane signal ATP, 28.1 nmol/mg of protein, after stimulation with formyl-peptide and their ATP-forming activity was the highest among the target cells studied. This suggests that plasmatic membrane signal ATP is involved in membrane transduction of a signal to activation of neutrophils and macrophages.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1992

УДК 616-005.1-036.11-07:616.36-008.939.15-39]-02:615.356:577.161.3

С. Б. Матвеев, В. В. Марченко, П. П. Голиков

ВЛИЯНИЕ α -ТОКОФЕРОЛА НА ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ В ПЕЧЕНИ ПРИ ОСТРОЙ КРОВОПОТЕРЕ

НИИ СКОРОЙ ПОМОЩИ им. Н. В. Склифосовского Минздрава РСФСР, Москва

Вопросам изучения процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) при кровопотере посвящены работы, касающиеся в основном постреанимационного периода и геморрагического шока. Установлена активация ПОЛ в головном мозге, сердце и легких во время клинической смерти, вызванной смертельной кровопотерей [6—8, 23], и в печени [13, 14], а также в лимфе [25] при геморрагическом шоке. Печень является одним из основных органов, регулирующих обмен липидов. Острая кровопотеря вызывает нарушения различных функций печени [5, 10, 12]. Можно предположить, что в нарушении метаболизма при острой кровопотере важную роль играет активация ПОЛ в печени.

В связи с этим представляет интерес изучение уровней продуктов ПОЛ и эндогенного антиоксиданта α -токоферола (ТФ) в печени, а также активности печеночных ферментов в крови, косвенно указывающей на функцию печени, при острой кровопотере и влияния на эти показатели экзогенно введенного антиоксиданта ТФ.

Методика. Исследование проведено на 47 крысах-самках линии Вистар массой 250—390 г, содержащихся на обычном рационе. Животных наркотизировали нембуталом (40 мг/кг внутривенно). Острую кровопотерю осуществляли из сонной артерии в объеме 2 % массы животного в течение 10 мин. Животные были разделены на 3 группы. В 1-ю группу включено 16 животных с контрольной операцией (воспроизведены все этапы операции, кроме кровопускания), во 2-ю — 15 крыс с кровопотерей, в 3-ю — 16 крыс с кровопотерей, получавших ТФ, который вводили внутривенно в дозе 50 мг/кг однократно через 5 мин после кровопотери. Исследования проводили через 2, 4 и 24 ч после острой кровопотери. Печень гомогенизировали в охлажденном фосфат-бифосфатном буфере pH 7,4 в соотношении 1:3 (вес:объем). Содержание ТФ в гомогенате определяли спектрофлуориметрически в гексановом экстракте [21]. В том же экстракте измеряли концентрацию диеновых конъюгатов (ДК) [11] и шиффовых оснований (ШО) [19]. Уровень малонового диальдегида (МДА) исследовали в бутаноловом экстракте спектрофлуориметрически [18]. Содержание общих липидов определяли фосфованилиновым методом с использованием наборов «Lachema» (ЧСФР). Все операции с гомогенатом производили при 4 °С. Результаты выражали: для ТФ — в $\text{мкг} \cdot \text{ч}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$, для ДК — в $\Delta D_{233} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$, для МДА — в $\text{нмоль} \cdot \text{г}^{-1}$, для ШО — в $I_{\text{фл}} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ (г — масса ткани печени; мг — количество общих липидов в 1 мл гексанового экстракта; ΔD_{233} — изменение оптической плотности при

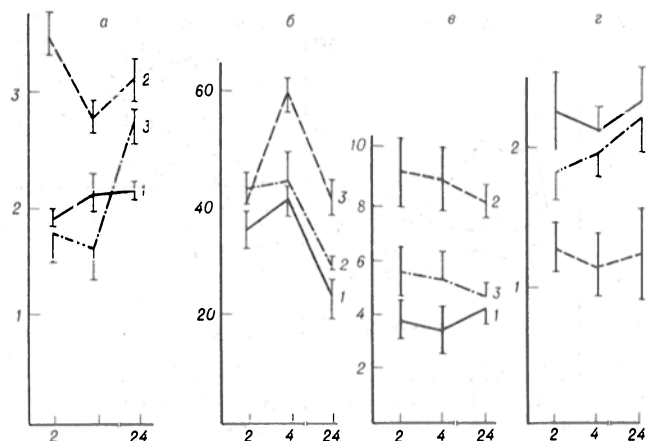


Рис. 1. Содержание продуктов ПОЛ и ТФ в печени крыс после кровопотери.

По осям абсцисс — время после операции, ч; по осям ординат: а — содержание ДК, $\Delta D_{233} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$, б — содержание МДА, нмоль/г , в — содержание ШО, $I_{\text{фл}} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$, г — содержание ТФ, $\text{мкг} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$. Здесь и на рис. 2: 1 — контрольная операция; 2 — кровопотери; 3 — кровопотеря + ТФ.

233 нм; $I_{\text{фл}}$ — интенсивность флуоресценции в условных единицах). Определение активности АСТ и АЛТ в сыворотке крови проводили с помощью наборов фирмы «Serene» (Швейцария) на анализаторе «Centrifichem-600» (Великобритания). Результаты выражали в международных единицах (МЕ/л). Данные обрабатывали методом вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. После контрольной операции содержание ДК в печени находилось почти на одном и том же уровне на всех сроках исследования. Через 2 ч после кровопотери содержание ДК увеличивалось в 1,84 раза, через 4 ч — в 1,32 раза и через 24 ч — в 1,42 раза. Под влиянием ТФ уровень ДК в печени животных с острой кровопотерей снижался по сравнению с таковым у животных, которым ТФ не вводили, в 2 и 1,7 раза соответственно через 2 и 4 ч после кровопотери. Спустя сутки ТФ не проявлял антиоксидантных свойств (рис. 1). Следовательно, введение ТФ снижает содержание ДК только через 2 и 4 ч после кровопотери до уровня у животных с контрольной операцией.

Содержание вторичного продукта ПОЛ — МДА в печени достоверно не отличалось через 2 и 4 ч после контрольной операции. Увеличение уровня МДА обнаруживалось только через 4 и 24 ч после острой кровопотери соответственно в 1,44 и 1,77 раза по сравнению с показателями животных с контрольной операцией. При введении ТФ животным с кровопотерей не наблюдалось увеличения МДА в печени во все сроки исследований, и его уровень был таким же, как у животных с контрольной операцией.

Контрольная операция не влияла на уровень ШО в печени по срокам исследований. Отмечалась только тенденция к увеличению ШО через сутки после контрольной операции. После острой кровопотери происходило повышение содержания ШО в 2,38, 2,54 и 1,88 раза соответственно срокам исследований. При введении ТФ животным с острой кровопотерей отмечалось снижение содержания ШО в печени через 2 ч после кровопотери в 1,64 раза, через 4 ч в 1,71 раза и через 24 ч в 1,73 раза. Эти результаты достоверно не отличались от таковых у животных с контрольной операцией.