

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)

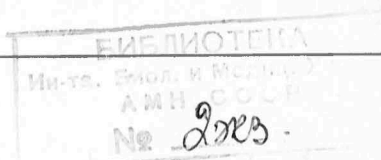
ТУРАКУЛОВ Я. Х. (Ташкент)

ТЯХЕПЫЛД Л. Я. (Тарту)

ШАПОВ В. С. (Москва)

ЯКОВЛЕВ Н. Н. (Ленинград)

ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)



30. Chun L., Patterson P. // J. Cell. Biol. — 1977. — Vol. 75. — P. 694—704.
31. Edgar D., Barde Y. // Trends Neurosci. — 1983. — Vol. 6. — P. 260—262.
32. Johnson E., Macia J. // Brain Res. — 1979. — Vol. 171. — P. 461—472.
33. Kessler J., Black I. // Ibid. — 1980. — Vol. 189. — P. 157—168.
34. Levi-Montalcini R. // Progr. Brain Res. — 1976. — Vol. 45. — P. 235—257.
35. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
36. Manning P., Russell J., Sommons B. et al. // Brain Res. — 1985. — Vol. 340. — P. 61—69.
37. Marx J. // Science. — 1986. — Vol. 232. — P. 1341—1342.
38. Thoenen H., Barde Y., Edgar D. // Life Sci. Res. Rept. — 1982. — Vol. 24. — P. 173—185.

Поступила 30.12.87

EFFECTS OF NERVE GROWTH FACTOR, GUANETHIDINE AND THEIR MIXTURES ON ACTIVITY OF NUCLEASES IN ANIMAL TISSUES

V. N. Kalyunov, G. P. Petrusenko, K. V. Fomichenko

Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Byelorussian SSR, Minsk

Activity of ribo- and deoxyribonucleases RNAases I and II, DNAases I and II was studied in brain hemispheres, liver, kidney and heart tissues of one-month-old rats, which were administered daily, beginning from birth either with nerve growth factor 15 µg/kg, guanethidine 30 µg/kg or with these compounds simultaneously at the doses mentioned above. Activity of the nucleases studied was altered in nervous tissue and in vegeto-dependent tissues after separate treatment with both nerve growth factor and guanethidine, while their simultaneous administration caused slight normalization but not to complete recovery of the patterns studied.

УДК 612.112.94.015.2:612.6].063.08

А. А. Карелин, В. С. Демидова, А. Г. Глоба, А. И. Марчук,
Б. В. Втюрин

СТИМУЛИРУЕМОЕ ИНТЕРЛЕЙКИНОМ-2 ОБРАЗОВАНИЕ АТФ ПРЕПАРАТАМИ ОБОГАЩЕННЫХ ПЛАЗМАТИЧЕСКИМИ МЕМБРАНАМИ ЧАСТИЦ ИЗ Т-КЛЕТОК

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

Интерлейкин-2 (ИЛ-2) является регуляторным пептидом, имеющим большое значение для роста и дифференциации антигенспецифических Т-лимфоцитов и больших гранулярных лимфоцитов тимуса [11, 25]. Взаимодействие ИЛ-2 со своим специфическим рецептором приводит к ускорению S-фазы клеточного цикла, к изменению определенных клеточных окружений, а также стимулирует Т-лимфоциты к продукции и высвобождению γ-интерферона [10, 13, 26]. Установлено [24], что рецепторы для ИЛ-2 существуют в двух формах, различающихся по аффинитету к лиганду: низкоаффинные и высокоаффинные. Изменение конформации рецепторов, например в результате преобработки фитогемагглютинином, увеличивает аффинность к лиганду. Охарактеризовано связывание ИЛ-2 с высокоаффинными специфическими рецепторами [9, 23]. Однако внутриклеточные механизмы, посредством которых это лигандорецепторное взаимодействие активирует рост и диф-

ференциацию Т-лимфоцитов, остаются неясными. Ранее сообщалось [1—6] об активации процессов фосфорилирования образованием АТФ на плазматических мембранах клеток-мишеней в ответ на различные опосредуемые рецептором пептидные сигналы. Показано, что сигналиндуцированный мембраносвязанный АТФ играет важную роль в трансдукции гормонального сигнала благодаря фосфорилированию с помощью тирозинспецифических протеинкиназ или протеинкиназы С ключевых регуляторных белков [6]. Имеются литературные данные об участии протеинкиназы С в процессе активации Т-лимфоцитов под действием ИЛ-2 [12]. Под влиянием этого же фактора наблюдалось фосфорилирование мембранных и цитозольных белков в Т-лимфоцитах.

В настоящем сообщении приводятся факты, свидетельствующие, что процесс активации Т-клеток ИЛ-2, по-видимому, сопряжен с образованием мембраносвязанного АТФ.

Методика

В работе были использованы аденозин-5'-дифосфата натриевая соль (АДФ), никотинамиддинуклеотид (НАД), никотинамиддинуклеотид восстановленный (НАД·Н) ("Reanal", Венгрия); D, L-β-оксимасляной кислоты натриевая соль ("Loba Chemie", Австрия); ротенон (ВРН, Англия); никотинамиддинуклеотидфосфат (НАДФ), глицилглицин, D-глюкоза, трис(оксиметил)-аминометан, бычий сывороточный альбумин — БСА (фракция V), аденилил-β, γ-имидодифосфат, антимицин А, нафталин, смола Дауэкс 1×8 (100—200 меш), N—2-оксизетилинперазин-N-этансульфоновая кислота ((NEPES) ("Segu", ФРГ); глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (КФ 1.1.49), ИЛ-2 из человеческих лимфоцитов (активность 200 ед/мл) ("Boehringer Mannheim", ФРГ); гекокиназа (КФ 2.7.1.1.), дифенилксазол (ППО) ("Fluka", Швейцария); цитохром с из сердца лошади, фитогемагглютинин, этиленгликоль-бис-(β-аминоэтил)N,N'-тетраацетат (ЭГТА) ("Sigma", США); конканавалин А, 5-фторсульфобензоиладенозин (ФСБА), фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ) ("Calbiochem", США); декстран Т-70, фиколл-400 ("Pharmacia", Швеция); верографи (СПОФА, ЧССР); [¹⁴C] АТФ (аденозин-5'-трифосфат ¹⁴C (U) уд. радиоактивность 17,02 ГБк/ммоль (ЧССР); цитрат натрия, дифенилксазолилбензол (ПОПОП), сахараза, диоксан, этанол, среда 199 с раствором Хенкса pH 7.2, NaHCO₃, KCl, MgCl₂, ЭДТА, MgSO₄, NaF, K₂HPO₄, жидкий азот («Союзреактив», квалификация не ниже х. ч.).

Для приготовления препаратов обогащенных плазматическими мембранами частиц (ОПМЧ) из Т-клеток Т-лимфоциты получали из тимуса 4—6-недельных крыс-самцов линии Вистар, как описано в работе [18], с некоторыми модификациями. Собранные железы после отмычки от крови 0,001 М бикарбонатным буфером pH 7,4 измельчали на льду и продавливали через нейлоновую сетку. Из полученного гомогената интактные тимоциты осаждали центрифугированием при 200 g в течение 15 мин при температуре 0—2°C. Дальнейшее приготовление препарата ОПМЧ из Т-лимфоцитов тимуса крыс осуществляли, как описано в работе [18].

Из периферической крови человека Т-лимфоциты выделяли, как описано в работе [12], с некоторыми модификациями. Для осаждения эритроцитов использовали 3 % раствор декстрана Т-70. Нейтрофилы и неосажденные эритроциты отделяли центрифугированием с применением системы фиколл — верографии с плотностью 1,077 [8]. Полученное кольцо лимфоцитов на границе градиент — плазма отмывали 0,9 % раствором хлорида натрия, затем ресуспендировали в среде 199 с раствором Хенкса, pH 7.2. Суспензию наносили на колонку с двумя слоями нейлоновой сетки [15]. Инкубировали при температуре 37°C в течение 10 мин. После инкубации Т-лимфоциты элюировали теплой (37°C) средой 199 с раствором Хенкса, pH 7.2. Из элюата Т-лимфоциты осаждали центрифугированием при 200 g в течение 10 мин. Для получения препаратов ОПМЧ Т-клетки суспендировали в среде, содержащей 20 mM трис-HCl-буфера pH 7.5; 0,33 сахаразы, 2 mM ЭДТА, 0,5 mM ЭГТА, и 2 mM ФМСФ, и разрушали клетки в гомогенизаторе Даунса многократными (5—7 раз) ударами пестика. Затем ядра и разрушенные клетки осаждали из гомогената

центрифугированием при 200 g в течение 5 мин согласно [18]. Фракцию препарата ОПМЧ из Т-лимфоцитов периферической крови человека осаждали при 25 000 g в течение 40 мин согласно [12]. Осадок многократно (3—4 раза) промывали в среде описанного выше состава и конечный осадок получали после центрифугирования при 150 g в течение 15 мин. Конечный осадок, представляющий собой препарат ОПМЧ из Т-клеток, суспендировали в нужном объеме холодного раствора 0,25 М сахаразы и использовали в экспериментах. Все процедуры выделения проводили при 0—4°C.

Препарат ОПМЧ из Т-клеток преинкубировали с конканавалином А (40 мкг/мл) при 37°C в водяной бане аппарата Варбурга в течение времени, необходимого по условиям эксперимента, затем быстро охлаждали на льду. Далее 1,5 мл суспензии препарата ОПМЧ из Т-клеток вносили в инкубационные сосудики Эрленмейера, куда предварительно были добавлены остальные компоненты реакционной среды, объемом 1,9 мл. Реакционная смесь в каждой колбочке Эрленмейера общим объемом 3,6 мл, включая 1,5 мл суспензии мембран, содержала в конечной концентрации: 40 mM трис-HCl-буфер pH 7.5, 2,5 mM MgSO₄, 2 mM АДФ, 5 mM K₂HPO₄, 20 mM NaF, 0,01 mM НАД·Н, 10 mM β-оксимасляной кислоты натриевую соль, 277 мкг/мл БСА, 0,1 mM цитохром с, 1,5 мкМ антимицин А, 1 mM KCN, 7,61 мкМ ротенон, 2 мкМ ФСБА, 76 mM сахарозу [1]. В экспериментальные пробы вносили фитогемагглютинин (1,1 мкг/мл инкубационной среды), затем 0,2 мл (40 ед/3,6 мл инкубационной среды) ИЛ-2. В контрольные пробы вносили эквивалентное количество 0,001 М триглицинового буфера pH 7,4. Инкубацию начинали немедленно после внесения в среду ИЛ-2 и осуществляли ее при 30°C в атмосфере 100 % кислорода при встряхивании. Время инкубации определялось условиями эксперимента. Дальнейшие процедуры остановки реакции путем замораживания в жидком азоте, нагревания при 100°C, выделения АТФ методами хроматографии в колонках и на бумаге выполняли, как описано ранее [2]. Контроль за полнотой элюции с колонок осуществляли путем внесения ¹⁴C-АТФ (20 мкл, 500 имп/мин) в элюируемые образцы [4]. Содержание АТФ в лиофилизатах определяли по восстановлению НАДФ в присутствии гекокиназы, глюкозы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы спектрофлуориметрическим методом [17]. Стимулирующий эффект ИЛ-2 определяли по разности количества АТФ в пробах, инкубированных в присутствии ИЛ-2 и без него, и обозначили ΔАТФ. Содержание белка в препаратах ОПМЧ из Т-клеток определяли по методу [20], радиометрию проб проводили на сцинтилляционном счетчике SL-4000 ("Roche Bioelectronique", Франция), флуоресценцию измеряли на спектрофлуориметре MPF-4A ("Hitachi", Япония). Морфологический контроль препарата ОПМЧ из Т-клеток осуществляли электронным микрокопированием.

Результаты и обсуждение

Экспрессию рецепторов для ИЛ-2 на Т-лимфоцитах мы индуцировали преинкубацией препарата ОПМЧ в тече-

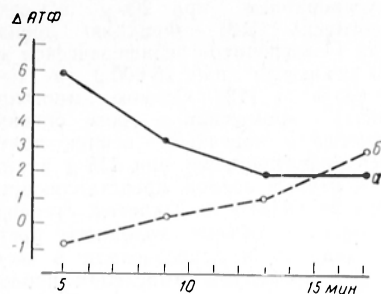


Рис. 1. Зависимость накопления мембраносвязанного АТФ препаратами ОПМЧ, выделенными из Т-лимфоцитов тимуса крысы (кривая а) или из Т-лимфоцитов периферической крови человека (кривая б), от длительности преинкубации с конканавалином А (40 мкг/мл) при 4 °С.

По оси ординат — прирост АТФ, нмоль на 1 мг белка за 1 мин; по оси абсцисс — длительность преинкубации, мин.

ние 2 мин при температуре 37 °С с конканавалином А (40 мкг/мл) [21]. По данным 9 независимых опытов, прирост мембраносвязанного АТФ в ответ на стимуляцию ИЛ-2 составлял $4,58 \pm 0,48$ нмоль на 1 мг белка при инкубации в течение 1 мин препаратов ОПМЧ Т-лимфоцитов из тимуса крысы в полной инкубационной среде при 30 °С в присутствии фитогемагглютина (1,1 мкг/мл). В контрольных пробах (без ИЛ-2) было синтезировано $3,73 \pm 1,00$ нмоль, а в присутствии ИЛ-2 — $8,31 \pm 0,96$ нмоль АТФ на 1 мг белка; различие статистически достоверно ($p < 0,01$).

Выявлена зависимость между количеством синтезированного АТФ и длительностью экспозиции препаратов ОПМЧ из Т-клеток с конканавалином А. Максимальное накопление АТФ наб-

людали к 5-й минуте экспозиции препарата ОПМЧ из Т-лимфоцитов, изолированных из тимуса крысы, с конканавалином А при 4 °С (рис. 1).

Положительные результаты по ИЛ-2-стимулируемому синтезу АТФ получены в экспериментах с препаратом ОПМЧ из Т-лимфоцитов периферической крови человека, а также в экспериментах с препаратом ОПМЧ из Т-лимфоцитов тимуса крысы, когда первоначальную преинкубацию с конканавалином А осуществляли в течение 2 мин при 37 °С в водяной бане, а дальнейшую преинкубацию (экспозиция) с конканавалином А продолжали при 4 °С в течение 5, 9, 13 или 17 мин (см. таблицу).

Выявлена зависимость между длительностью экспозиции препарата ОПМЧ из Т-клеток с конканавалином А при 4 °С и количеством синтезированного АТФ за 1 мин инкубации этих препаратов в полной инкубационной среде в присутствии ИЛ-2 при 30 °С (см. рис. 1). В препаратах ОПМЧ из Т-лимфоцитов тимуса крысы происходит снижение уровня синтезированного АТФ после 5 мин преинкубации, а в препаратах ОПМЧ из Т-лимфоцитов периферической крови человека, наоборот, отмечали постепенное накопление мембраносвязанного АТФ, что можно объяснить различиями механизмов экспрессии рецепторов Т-лимфоцитов крысы и человека для ИЛ-2. Возможно, экспрессия рецепторов для ИЛ-2 Т-лимфоцитов тимуса крысы при их взаимодействии с конканавалином А происходит непосредственно, тогда как экспрессия рецепторов для ИЛ-2 Т-лимфоцитов человека включа-

Зависимость АТФ-образующей активности препаратов ОПМЧ, изолированных из Т-лимфоцитов периферической крови человека или из тимуса крысы при их стимуляции ИЛ-2 от длительности преинкубации препаратов с конканавалином А

Длительность преинкубации с конканавалином А, мин	Продукция АТФ, в нмолях на 1 мг белка за 1 мин при 30 °С					
	Т-лимфоциты из тимуса крысы			Т-лимфоциты периферической крови человека		
	без ИЛ-2	+ИЛ-2	Δ АТФ	без ИЛ-2	+ИЛ-2	Δ АТФ
5	3,16	9,09	5,93	10,43	9,67	-0,76
9	2,84	6,17	3,33	9,34	9,59	0,25
13	4,48	6,43	1,95	8,09	9,08	0,99
17	3,06	5,05	1,99	8,89	11,65	2,76

Примечание. Первоначальную преинкубацию препаратов ОПМЧ из Т-клеток осуществляли при 37 °С в течение 2 мин с конканавалином А (40 мкг/мл), далее преинкубацию проводили при 4 °С в течение времени, указанного в таблице. Инкубацию мембранного материала с ИЛ-2 проводили в полной инкубационной среде при 30 °С в атмосфере 100 % кислорода в течение 1 мин.

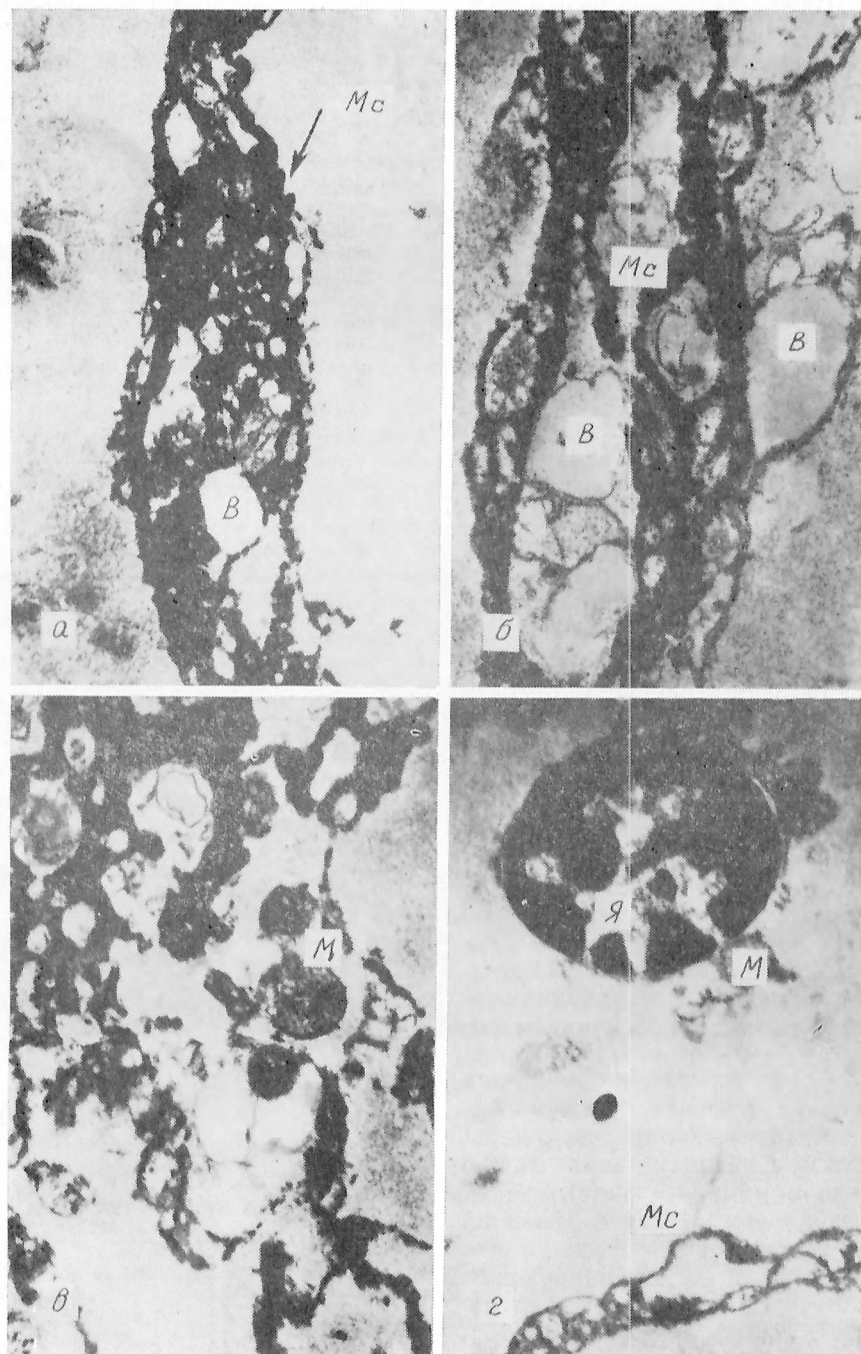


Рис. 2. Электронно-микроскопическое изображение препаратов ОПМЧ Т-лимфоцитов из тимуса крысы.

а — агрегаты мембранных структур (*Mc*) тимоцитов, включая внешнюю клеточную мембрану; *б* — наличие увеличенных вакуолей (*B*) в мембранных структурах (*Mc*); *в* — скопление мембранных структур, вакуолей, митохондрий (*M*); *г* — ядро (*Я*), митохондрия (*M*) и участок паружной клеточной мембраны с вакуолей. Ув. 18 000.

ет промежуточную стадию фосфорилирования каких-либо регуляторных белков [24]. Продолжительность первоначальной преинкубации препаратов ОПМЧ из Т-клеток при 37°C была подобрана экспериментально и составила 2 мин, однако когда преинкубация продолжалась более 5 мин, стимулирующий эффект ИЛ-2 на синтез АТФ исчезал.

Обнаруженная связь между активацией Т-клеток, стимулируемой ИЛ-2, и накоплением АТФ позволяет предположить, что этот АТФ необходим для переноса трансмембранного сигнала. Известно, что в передаче информации через плазматические мембраны Т-клеток от рецептора для ИЛ-2, как и от рецепторов других внеклеточных сигналов, важную роль играет Ca^{2+} -фосфолипидзависимая протеинкиназа С [22], которая регулирует многие Ca^{2+} -зависимые процессы [16]. На ранних стадиях клеточных ответов фермент обеспечивает как положительный, так и отрицательный контроль ферментов и белков-мишеней [16] по принципу обратной связи через механизм их фосфорилирования. Например, ИЛ-2 подавляет активность аденилатциклазы в изолированных периферических Т-лимфоцитах человека [7]. Подавление активности аденилатциклазы наблюдается только при взаимодействии ИЛ-2 с цельными клетками и не проявляется при добавлении ИЛ-2 к изолированным плазматическим мембранам. Однако при встраивании очищенной протеинкиназы С в плазматические мембраны и ее активации посредством АТФ и Ca^{2+} наблюдается восстановление эффекта ингибирования аденилатциклазы, присущего цельным клеткам. Следовательно, можно считать, что мембраносвязанный АТФ, образующийся при действии ИЛ-2 на рецепторы Т-лимфоцитов, является вторичным мессенджером, активирующим протеинкиназу С, возможно, через реакцию аутофосфорилирования [14, 19].

Электронно-микроскопическое исследование препаратов ОПМЧ из Т-лимфоцитов периферической крови человека и тимуса крыс, использованных в экспериментах, показало, что плазматические мембраны, где, по нашим предположениям, происходит синтез «сигнального» АТФ, собраны в агрегаты и имеют замкнутую форму (рис. 2). Это благоприятствует протеканию

электронно-транспортных и ионно-транспортных процессов, с которыми сопряжено, по-видимому, образование мембраносвязанного короткоживущего АТФ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Карелин А. А. // Вопр. мед. химии. — 1980. — № 2. — С. 220—227.
2. Карелин А. А. // Там же. — 1981. — № 5. — С. 679—685.
3. Карелин А. А. // Вести. АМН СССР. — 1983. — № 7. — С. 74—85.
4. Карелин А. А., Глоба А. Г., Демидова В. С. и др. // Вопр. мед. химии. — 1985. — № 2. — С. 111—117.
5. Карелин А. А. // Вести. АМН СССР. — 1986. — № 8. — С. 77—90.
6. Карелин А. А. // Там же. — 1987. — № 7. — С. 35—41.
7. Beckner S. K., Farrar W. L. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1987. — Vol. 145. — P. 176—182.
8. Bøyum A. // Scand. J. clin. Lab. Invest. — 1968. — Suppl. 97. — P. 77—89.
9. Cantrell D. A., Smith K. A. // J. exp. Med. — 1983. — Vol. 158. — P. 1895—1911.
10. Cantrell D. A., Smith K. A. // Science. — 1984. — Vol. 224. — P. 1312—1316.
11. Domzig W., Stadler B. M., Herberman R. B. // J. Immunol. — 1983. — Vol. 130. — P. 1970—1976.
12. Farrar W. L., Anderson W. B. // Nature (Lond.). — 1985. — Vol. 315. — P. 233—235.
13. Farrar W. L., Johnson H. M., Farrar J. J. // J. Immunol. — 1980. — Vol. 126. — P. 1120—1128.
14. Huang K. P., Chan K. F., Singh T. J. et al. // J. biol. Chem. — 1986. — Vol. 261. — P. 12134—12140.
15. Julius M. H., Simpson E., Herzenberg L. A. // Europ. J. Immunol. — 1973. — Vol. 3. — P. 645—649.
16. Kikkawa V., Nishizuka Y. // Biochem. Soc. Trans. — 1987. — Vol. 15. — P. 124—125.
17. Kornberg A. // J. biol. Chem. — 1950. — Vol. 182. — P. 779—793.
18. Lin J., Krishnaraj R., Kemp R. G. // J. Immunol. — 1985. — Vol. 136. — P. 3403—3410.
19. Le Peuch C. J., Ballester R., Rosen O. M. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1983. — Vol. 80. — P. 6858—6862.
20. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
21. Mire A. R., Wickremasinghe R. G., Michalevich R., Hoffbrand A. V. // Biochim. biophys. Acta. — 1985. — Vol. 845. — P. 159—163.
22. Nishizuka Y. // Science. — 1986. — Vol. 233. — P. 305—312.
23. Robb R. J., Munck A., Smith K. A. // J. exp. Med. — 1981. — Vol. 154. — P. 1446—1465.
24. Robb R., Rush C. M. // J. Immunol. — 1986. — Vol. 137. — P. 142—149.
25. Ruscetti F. W., Morgan D. A., Gallo R. C. // Ibid. — 1977. — Vol. 119. — P. 131—138.
26. Smith K. A. // J. Immunol. Res. — 1983. — Vol. 57. — P. 337—357.

INTERLEUKIN-2 STIMULATED FORMATION OF ATP IN PARTICLES OF T CELLS ENRICHED WITH PLASMATIC MEMBRANES

A. A. Karelin, V. S. Demidova, A. G. Globa,
A. I. Marchuk, B. V. Vlyurin

A. V. Vishnevsky Institute of Surgery, Academy
of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Distinct increase in content of ATP was
found in preparations of enriched with plasma-
tic membranes particles from rat thymus T lym-

phocytes and from human peripheric blood T
lymphocytes after their incubation with inter-
leukin-2 as compared with controls which did
not contain the peptide. The phenomenon obser-
ved was manifested only if these particles from
T cells were preincubated with concanavaline A
(2 min, 40 $\mu\text{g/ml}$), which is required to expres-
sion of the receptors for interleukin-2. The mem-
brane-bound ATP, formed after the interleukin-2
effect on receptors of T lymphocytes, appears
to serve as the secondary messenger activating
protein kinase C.

УДК 616.36-006-07:616-008.938.57

Ю. В. Тихонов, И. С. Мейснер, А. М. Пименов, Р. Т. Тогузов

ОСОБЕННОСТИ ОБМЕНА ПУРИНОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ГЕПАТОМЕ 22. ПЕЧЕНИ И ЭРИТРОЦИТАХ КРОВИ МЫШЕЙ В ПРОЦЕССЕ РАЗВИТИЯ ОПУХОЛИ

Отдел биохимии Межфакультетского лабораторного комплекса II ММИ им. Н. И. Пи-
рогова

К важнейшим проявлениям действия
опухоли на организм относятся нару-
шение нуклеинового обмена, изменение
характера биосинтеза предшественни-
ков нуклеиновых кислот в органах и
тканях, непосредственно не затронутых
опухолевым процессом [1, 12, 15].
С другой стороны, развитие самой нео-
плазмы сопровождается перестройкой
функционирования ферментных систем
обмена пуриновых производных в опу-
холевых клетках, связанной с измене-
нием потенциальной активности фер-
ментов биосинтеза *de novo*, реутилиза-
ции нуклеозидов и азотистых основа-
ний, а также ферментов их катаболизма
[5, 17]. В условиях *in vivo* это мо-
жет обусловить специфический харак-
тер взаимодействия растущей опухоли
с тканями организма на уровне соеди-
нений пуринового ряда, заключающий-
ся не только в успешной конкуренции
опухолевых клеток с тканями организ-
ма за промежуточные метаболиты [4],
но и в трансформации обмена пред-
шественников нуклеиновых кислот в
удаленных от опухоли органах.

В печени животных, играющей цент-
ральную роль в обмене пуринов, пред-
ставлены все ферменты, катализирую-
щие начальные, промежуточные и ко-
нечные реакции синтеза и распада
нуклеотидов [13]. Поскольку эритро-
циты крови служат эффективной систе-
мой транспорта и доставки свободных
нуклеозидов и их оснований к различ-
ным тканям [8, 10], анализ особеннос-
тей формирования качественного и

количественного пула нуклеотидов,
нуклеозидов и оснований в этих тка-
нях, а также в ткани самой опухоли
необходим для понимания характера
нарушений их обмена в процессе раз-
вития опухоли.

Методика

Опыты проводили на мышах-самцах СЗНА/
Kv массой 18—20 г. Солидную гепатому 22
перевивали под кожу спины (по $0,5\text{--}1,0 \times 10^6$
клеток). Материал брали через 1, 3, 5, 7,
9, 11 и 13 сут после инокуляции штамма опу-
холевых клеток. Материалом для исследования
служили печень, эритроциты и плазма крови
мышей, а также ткани гепатомы 22 (начиная
с 7-х суток эксперимента).

Кислоторастворимую фракцию (КРФ) с по-
мощью HClO_4 получали по описанной ранее
методике [3]. Хроматографический ВЭЖХ-ана-
лиз состава пуриновых производных КРФ изу-
чаемых тканей осуществляли, как описано в
работе [14]. Для оценки интенсивности вклю-
чения меченых пуринов в КРФ печени, эритро-
цитов и плазмы крови в процессе роста гепа-
томы 22 мышам вводили внутривенно по
10 мКи ^3H -гипоксантина и ^3H -инозина (удель-
ная радиоактивность 46 000 и 21 000 мКи/мМ
соответственно) за 5 мин до извлечения ис-
следуемых органов и тканей. Счет радиоактив-
ности в образцах (по 0,5 мл КРФ в 5 мл то-
луольного сцинтиллятора) проводили в жид-
костном сцинтилляционном счетчике LS 2800
("Beckman", США). Результаты получали в
распадах в 1 мин на 0,1 г (мл) ткани, ис-
пользуя расчетную программу автоматической
компенсации гашения.

Весь материал обрабатывали статистически
по методу Стьюдента, достоверными считали
различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В табл. 1 представлены данные по
содержанию пуриновых соединений в