

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича

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. Н. 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)

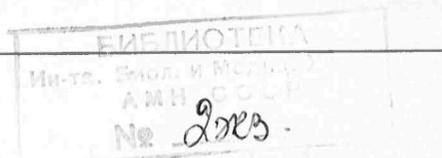
ТУРАКУЛОВ Я. Х. (Ташкент)

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.

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 vegcto-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.

Поступила 30.12.87

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 лигандрецепторное 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-оксиэтилпиперазин-N-этансульфоновая кислота ((HEPES) ("Segur", 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-фтороульфобензоиладенозин (ФСБА), фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ) ("Calbiochem", США); декстран Т-70, фиколл-400 ("Pharmacia", Швеция); верографин (СЮФА, 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 рН 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 отмывки от крови 0,001 М бикарбонатным буфером рН 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 °С. 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 — верографин 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, рН 7,2. Суспензию наносили на колонку с двумя слоями нейлоновой сетки [15]. Инкубировали при температуре 37 °С в течение 10 мин. После инкубации Т-лимфоциты элюировали теплой (37 °С) средой 199 с раствором Хенкса, рН 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 мМ трис-НСI-буфера рН 7,5; 0,33 сахаразы, 2 мМ ЭДТА, 0,5 мМ ЭГТА, и 2 мМ 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 °С.

Препарат ОПМЧ из Т-клеток преинкубировали с конканавалином А (40 мкг/мл) при 37 °С 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 мМ трис-НСI-буфер рН 7,5, 2,5 мМ MgSO₄, 2 мМ АДФ, 5 мМ K₂HPO₄, 20 мМ NaF, 0,01 мМ НАД·Н, 10 мМ β-оксимасляной кислоты натриевую соль, 277 мкг/мл БСА, 0,1 мМ цитохром с, 1,5 мкМ антимицин А, 1 мМ KCN, 7,61 мкМ ротенон, 2 мкМ ФСБА, 76 мМ сахаразу [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 рН 7,4. Инкубацию начинали немедленно после внесения в среду ИЛ-2 и осуществляли ее при 30 °С в атмосфере 100 % кислорода при встряхивании. Время инкубации определялось условиями эксперимента. Дальнейшие процедуры остановки реакции путем замораживания в жидком азоте, нагревания при 100 °С, выделения АТФ методами хроматографии в колонках и на бумаге выполняли, как описано ранее [2]. Контроль за полной элюцией 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 Bioelectronic", 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-

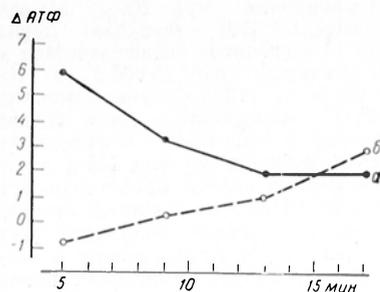


Рис. 1. Зависимость накопления мембраносвязанного АТФ препаратами ОПМЧ, выделенными из Т-лимфоцитов тимуса крысы (кривая а) или из Т-лимфоцитов периферической крови человека (кривая б), от длительности преинкубации с конканавалином А (40 мкг/мл) при 4 °С.

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

При мечании е. 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.

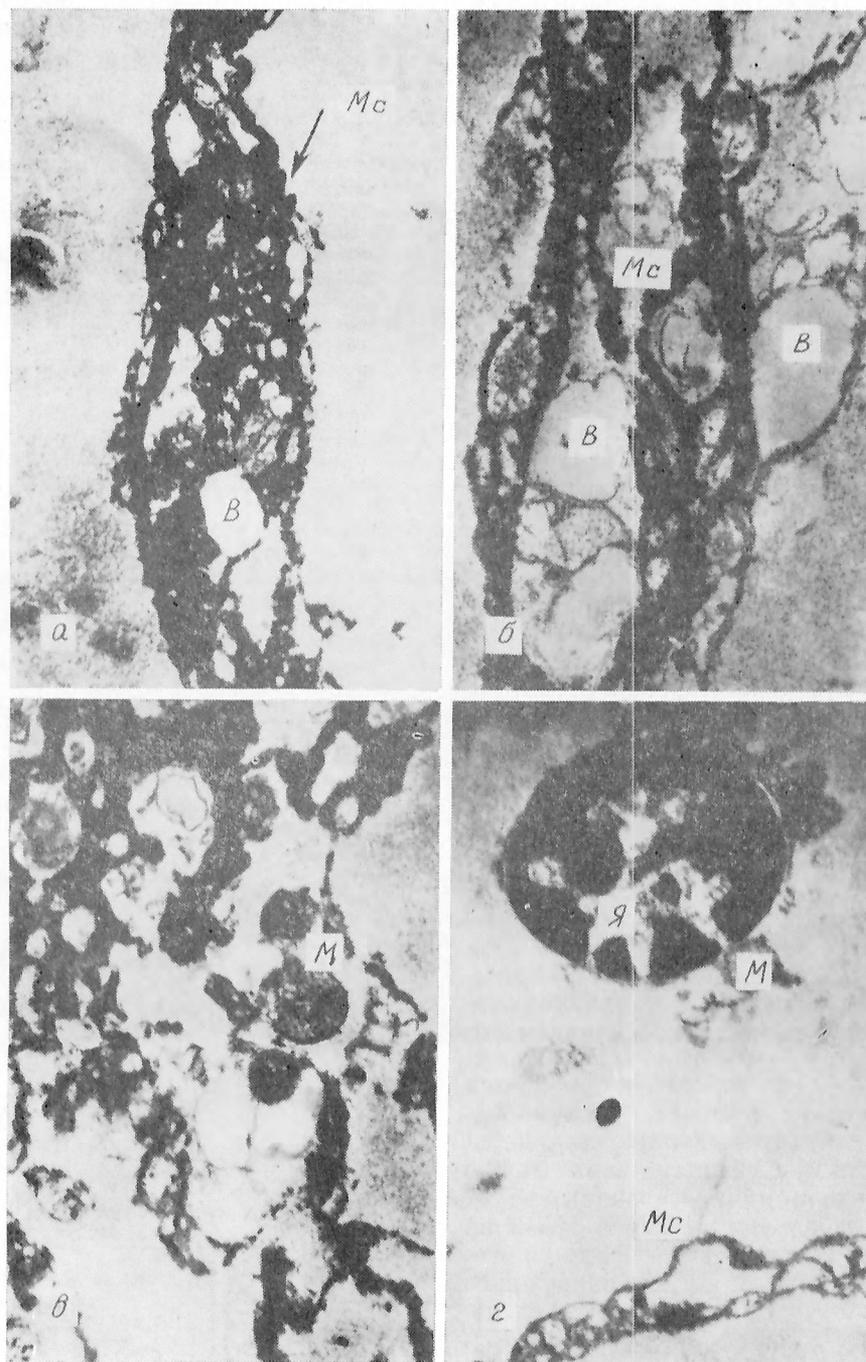


Рис. 2. Электронно-микроскопическое изображение препаратов ОПМЧ Т-лимфоцитов из тимуса крысы.

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. Boyum 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 plasmatic membranes particles from rat thymus T lym-

phocytes and from human peripheric blood T lymphocytes after their incubation with interleukin-2 as compared with controls which did not contain the peptide. The phenomenon observed 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 expression of the receptors for interleukin-2. The membrane-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. Пирогова

К важнейшим проявлениям действия опухоли на организм относятся нарушение нуклеинового обмена, изменение характера биосинтеза предшественников нуклеиновых кислот в органах и тканях, непосредственно не затронутых опухолевым процессом [1, 12, 15]. С другой стороны, развитие самой неоплазмы сопровождается перестройкой функционирования ферментных систем обмена пуриновых производных в опухолевых клетках, связанной с изменением потенциальной активности ферментов биосинтеза *de novo*, реутилизации нуклеозидов и азотистых оснований, а также ферментов их катаболизма [5, 17]. В условиях *in vivo* это может обусловить специфический характер взаимодействия растущей опухоли с тканями организма на уровне соединений пуринового ряда, заключающийся не только в успешной конкуренции опухолевых клеток с тканями организма за промежуточные метаболиты [4], но и в трансформации обмена предшественников нуклеиновых кислот в удаленных от опухоли органах.

В печени животных, играющей центральную роль в обмене пуринов, представлены все ферменты, катализирующие начальные, промежуточные и конечные реакции синтеза и распада нуклеотидов [13]. Поскольку эритроциты крови служат эффективной системой транспорта и доставки свободных нуклеозидов и их оснований к различным тканям [8, 10], анализ особенностей формирования качественного и

количественного пула нуклеотидов, нуклеозидов и оснований в этих тканях, а также в ткани самой опухоли необходим для понимания характера нарушений их обмена в процессе развития опухоли.

Методика

Опыты проводили на мышках-самцах СЗНА/Кв массой 18—20 г. Солидную гепатому 22 пересаживали под кожу спины (по 0,5—1,0 $\times 10^6$ клеток). Материал брали через 1, 3, 5, 7, 9, 11 и 13 сут после инокуляции штамма опухолевых 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 помощью HClO_4 получали по описанной ранее методике [3]. Хроматографический ВЭЖХ-анализ состава пуриновых производных КРФ изучаемых тканей осуществляли, как описано в работе [14]. Для оценки интенсивности включения меченых пуринов в КРФ печени, эритроцитов и плазмы крови в процессе роста гепатомы 22 мышам вводили внутривенно по 10 мкКи ^3H -гипоксантина и ^3H -инозина (удельная радиоактивность 46 000 и 21 000 мКи/мМ соответственно) за 5 мин до извлечения исследуемых органов и тканей. Счет радиоактивности в образцах (по 0,5 мл КРФ в 5 мл толуольного сцинтиллятора) проводили в жидкостном сцинтилляционном счетчике LS 2800 ("Beckman", США). Результаты получали в распадах в 1 мин на 0,1 г (мл) ткани, используя 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