

Архив журнала

Вопросы медицинской химии

ISSN 0042-8809

1990

Том 36 выпуск 2

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

1990

Volume 36 issue 2

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>

Activity of proteolytic enzymes and their inhibitors was studied in malignant and benign tumors of large intestine from 133 patients. Activity of proteinases was distinctly higher in malignant tumors as compared with unaltered tissue, while in benign tumor the enzymatic activity was similar to that of unaltered tissue. Inhibitor of proteinases exhibited lower activity in malignant tumor as compared with unaltered tissue and benign tumor. After irradiation treatment of tumors activity of the proteinases inhibitor was practically unaltered, while the enzymatic activity was distinctly decreased.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 578.833.26.083.21].04:578.245.2

К. А. Бакунц, М. Г. Геворкян, Э. Б. Тазулахова, Р. А. Захарян, Ф. И. Ершов

ВЛИЯНИЕ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ИНДУКТОРОВ ИНТЕРФЕРОНА (дсРНК) НА АДСОРБЦИЮ ВИРУСА

Институт экспериментальной биологии АН Армянской ССР, Ереван; НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи АМН СССР, Москва

В литературе имеются данные об участии системы цАМФ в реализации антивирусного и антипролиферативного эффекта наиболее активных индукторов интерферона — высокомолекулярных двуспиральных РНК (дсРНК) путем ингибирования синтеза РНК [6]. Предполагается, что цАМФ-зависимая протеинкиназа участвует в процессе активации латентной формы дсРНК-зависимой протеинкиназы. Последняя фосфорилирует α -субъединицу фактора инициации белкового синтеза [2, 3]. С другой стороны, дефосфорилирование этого фактора инициации осуществляется цАМФ-зависимой фосфопротеинфосфатазой [4]. Можно предположить, что воздействия дсРНК на клетки нервной ткани могут быть опосредованы регулируемым цАМФ фосфорилированием клеточных белков за счет активации зависимых от цАМФ протеинкиназ [9]. Нами получены результаты, свидетельствующие о том, что дсРНК действительно может индуцировать активность системы циклических нуклеотидов путем повышения уровня цАМФ, что обеспечивает относительно высокий уровень активности цАМФ-зависимой протеинкиназы в клетках головного мозга. Эта активация происходит, по-видимому, в период, предшествующий началу синтеза интерферона, и является одним из первых звеньев воздействия дсРНК на функционирование клеток головного мозга.

В настоящей работе изучена роль фосфорилирования белков плазматической мембраны клеток головного мозга в процессах адсорбции вируса энцефаломиокардита (ЭМК) мышей.

Методика

Ткани головного мозга крыс гомогенизировали в 5-кратном объеме 10 мМ MgCl₂. Очистку и выделение нейрональных плазматических мембран проводили по стандартному методу. При выделении цитозольной фракции гомогенизацию

проводили в буфере, не содержащем сахарозы, и центрифугировали при 100 000 г в течение 30 мин. Концентрацию белка во фракциях определяли по Лоури [8] и спектрофотометрированием.

Фосфорилирование белков проводили в инкубационной смеси, содержащей 50 мМ трис-НСl, рН 7,5; 10—25 мМ MgCl₂; 5—10 нМ (³²P) АТФ (0,1 мкКи/нмоль); 100 мкг белка в присутствии различных концентраций дсРНК и в ее отсутствие. Через определенные промежутки времени реакцию останавливали добавлением 50 % трихлоруксусной кислоты (ТХУ) до конечной концентрации 5 % и наносили на мембранные фильтры с последующей 3-кратной отмывкой 5 % ТХУ.

Электрофорез проводили в 10—12 % полиакриламидном геле — ПАГ (в блочной модификации). Для приготовления образцов реакцию останавливали добавлением (1:1) раствора, содержащего 0,05 М трис-НСl (рН 6,8), 10 % додецилсульфат натрия (ДСН), 0,1 М ЭДТА, 15 % глицерина, 5 % меркаптоэтанол и небольшое количество бромфенолового синего. Образцы кипятили в течение 1 мин и наносили на гель (40 мкл). После проведения электрофореза гель фиксировали, окрашивали раствором кумасси бриллиантового голубого R-250 и проводили автордиографию с использованием рентгеновской пленки РМ-1 в течение 5—7 дней.

Для получения меченого ³H-уридинного вируса ЭМК использовали 24-часовую однослойную культуру перевиваемой линии клеток L-929, которую заражали вирусом в разведении 10⁻², адсорбцию проводили при 37 °С в течение 1 ч. После адсорбции монослой промывали средней 199 и клетки инкубировали в той же среде с добавлением 10 % бычьей сыворотки и ³H-уридина до конечной концентрации 100 мкКи/мл в течение 24 ч. Культуральную вирусосодержащую среду осветляли при 10 000 г в течение 90 мин при 4 °С. Вирус осаждали центрифугированием при 30 000 об/мин в роторе Тi-35. Осадок ресуспендировали в буфере STE, наносили на 20 % сахарозу, центрифугировали при 36 000 об/мин в роторе SW-41 в течение 1,5 ч. Осадок вируса суспендировали в среде 199.

Монослой клеток L-929 выращивали в сцинтилляционных флаконах. В культуральную среду добавляли дсРНК в концентрации 50 мкг/мл и клетки инкубировали в течение различного времени — 1, 15, 20, 60 мин, 3 ч, среду удаляли и адсорбцию меченого вируса проводили в течение 1 ч. Затем вирус сливали, монослой тщательно трижды промывали средней 199, высушивали и заливали толуоловым сцинтиллятором. Пробы просчитывали в счетчике «Intertechnik».

Представляющая собой репликативную форму фага f-2 дсРНК (ларифан) была получена из Института микробиологии им. А. Кирхенштейна АН Латвийской ССР. Дрожжевая дсРНК была выделена из коммерческого препарата нуклеината натрия (производство Олайне).

Результаты и обсуждение

Индуктируемое дсРНК фосфорилирование белков наиболее отчетливо проявляется в мембранной фракции и цитозоле (прирост активности составляет 64 и 38 % соответственно) (табл. 1). Как известно [1, 7], цАМФ-зависимые протеинкиназы в мозге быка примерно поровну распределяются между цитозолем и тотальной фракцией, содержащей мембраны и органеллы клетки.

В присутствии дсРНК уровень фосфорилирования белков мембранной фракции повышается (рис. 1). Изучение кинетики фосфорилирования выявляет временную зависимость реакции фос-

Таблица 1

Эндогенное фосфорилирование клеточных фракций мозга крысы

Фракция	Максимальное фосфорилирование, нм/мин на 100 мкг белка		Степень активации)	Прирост активности, %
	-дсРНК	+дсРНК		
Цитозоль	5040	6960	1,38	38 %
Мембраны	3750	6145	1,64	64 %
Ядра	2305	2580	1,12	12 %

Влияние дсРНК на адсорбцию вируса ЭМК мышей на клетках L-929

Время, мин	дсРНК из нуклеината натрия, имп/мин	дсРНК фага f-2 (ларифан), имп/мин
Контроль	18 660	18 660
1	4 993	12 481
15	10 318	8 063
30	10 932	10 729
60	13 048	11 508
180	10 916	9 190

Примечание. Клетки предварительно обрабатывали дсРНК в течение указанного времени, после чего проводили адсорбцию меченого ³H-уридином вируса в течение 60 мин. Каждая цифра — средняя из 3 измерений.

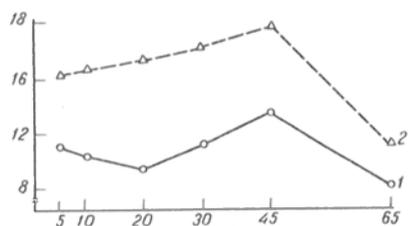


Рис. 1. Кинетика фосфорилирования белков мембранной фракции нейрональных клеток под действием дсРНК.

По оси абсцисс — длительность инкубации (в мин); по оси ординат — радиоактивность (в имп/мин · 10³). 1 — контроль; 2 — +дсРНК.

фосфорилирования: после определенного промежутка времени (45 мин) ее уровень прекращает увеличиваться и даже понижается. Поскольку снижение фосфорилирования имеет место как в присутствии, так и в отсутствие дсРНК, можно предположить, что оно связано в первую очередь с действием фосфопротенинфосфатаз.

Для характеристики фосфорилируемых эндогенных субстратов дсРНК-зависимой протеинкиназы был проведен электрофорез в ПАГ в присутствии ДСН с последующей радиоавтографией (рис. 2, см. на вклейке). Среди множества полос, соответствующих фосфорилированным белкам, удалось выявить такие, фосфорилирование которых усиливается в присутствии дсРНК. Спектр молекулярных масс фосфорилируемых белков в целом близок полученному ранее для белков мембранной фракции мозга при цАМФ-зависимом фосфорилировании [1]. Это белки с мол. м. 86, 80, 68, 48, 45, 35—40, 35—30, 13 килодальтон (кД). Помимо этого, при 20-минутной обработке дсРНК в мембранной фракции появляется новый фосфорилированный белок в зоне мол. м. 28—30 кД.

Сходство в спектрах молекулярных масс фосфорилированных белков при дсРНК- и цАМФ-зависимом фосфорилировании дает основание предположить, что дсРНК индуцирует процессы, приводящие к повышению уровня цАМФ, и, вероятно, параллельно включает систему регуляции цАМФ. Очевидно, повышение уровня протеинкиназы цАМФ через 20 мин после индукции цАМФ дсРНК обеспечивает регуляцию фосфорилирования белков плазматической мембраны нервных клеток. В пользу данного заключения свидетельствует полученный нами при действии дсРНК спектр молекулярных масс фосфорилируемых белков плазматической мембраны, в целом близкий молекулярным массам белков, фосфорилируемым системой цАМФ-зависимой протеинкиназы в плазматических мембранах клеток мозга быка и свиньи [1, 7].

Имеются данные, что фосфорилирование мембран в некоторых случаях приводит к подавлению сродства рецепторов к синаптическим медиаторам, имеющим пептидную природу. Мы предположили, что взаимодействие вирус — мембрана также может находиться в зависимости от степени фосфорилирования белков плазматической мембраны.

В табл. 2 представлены данные, демонстрирующие влияние различных дсРНК (ларифана и дсРНК из нуклеината натрия) на адсорбцию вируса ЭМК мышей на клетках L-929. Как вид-

но, высокомолекулярная дсРНК существенно (на 45—74 %) понижает адсорбцию вируса ЭМК на мембранах клеток L-929. дсРНК, гидролизованная до моно-, ди-, тетра-нуклеотидов, использованная в тех же концентрациях, практически не оказывала влияния на адсорбцию вируса.

Обращает на себя внимание очень ранний эффект подавления адсорбции вируса. Уже через 1 мин после обработки клеток дсРНК из нуклеината натрия подавление адсорбции достигает 74 %. Действие же ларифана наиболее выражено через 15 мин. Необходимо подчеркнуть, что воздействие дсРНК на сорбцию вируса носит двухфазный характер, он постепенно восстанавливается к 60-й минуте после обработки клеток препаратом, не достигая, однако, контрольных значений, и снова усиливается через 3 ч после обработки клеток дсРНК.

Этот относительно «поздний» эффект дсРНК (3 ч), приводящий к подавлению адсорбции вируса на 30—40 %, может быть объяснен, вероятно, индукцией интерферона. «Ранние» же эффекты дсРНК (1, 5 мин) позволяют предположить наличие иного механизма, обеспечивающего относительно низкий уровень связывания вируса с клетками. Этот механизм действует в отсутствие индукции интерферона и осуществляется, вероятно, на уровне молекулярных изменений внутри плазматической мембраны.

Из полученных результатов следует, что в условиях подавления дсРНК адсорбции вируса на клетках степень фосфорилирования белков плазматической мембраны существенно повышена.

Сопоставление динамики процессов усиления фосфорилирования белков плазматической мембраны и подавления адсорбции вируса, вызванного обработкой клеток дсРНК, позволяет предположить, что эти процессы взаимосвязаны. В условиях существенного повышения степени фосфорилирования мембранных плазматических белков значительно подавлена адсорбция вируса. Однако для окончательного выяснения роли фосфорилирования белков плазматической мембраны в десенситизации клеточной поверхности к адсорбции вируса требуются детальные исследования и установление прямой зависимости процесса подавления адсорбции вируса на клетках от степени фосфорилирования белков плазматической мембраны.

К ст. И. П. Гонгарь и соавт.



Электрофореграммы актина сердечной мышцы человека.

a — актин, выделенный по Штраубу; *b* — актин после очистки обратимой полимеризацией — денатурацией. Количество белка 100 мкг на гель. Окраска амидо черным 10 Б.

a *b*

К ст К. А. Бакунец и соавт.

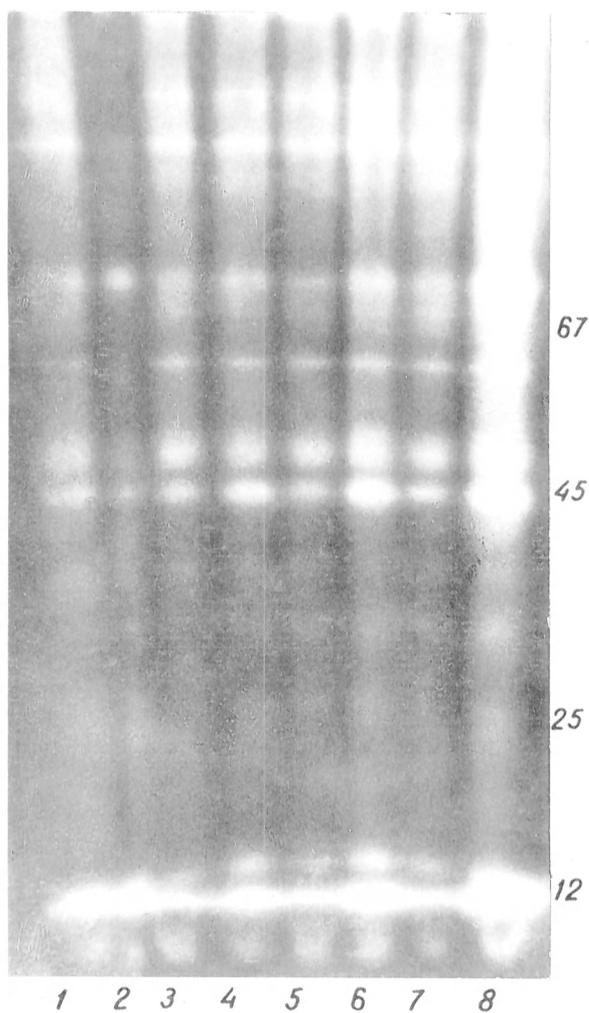


Рис. 2. Кинетика эндогенного фосфорилирования белков мембранной фракции в присутствии и в отсутствие дсРНК. Авторадиография электрофореграмм 10 % ПАГ. 1, 3, 5, 7 — в отсутствие дсРНК, 2, 4, 6, 8 — в присутствии дсРНК; инкубация 5, 10, 20, 30 мин соответственно.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кочетков С. Н., Абдурагимов А. Р., Лукашина Т. Н., Северин Е. С. // Биохимия.— 1984.— Т. 49, № 2.— С. 344—348.
2. Datta A., DeHaro C., Sierra J. M., Ochoa S. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1977.— Vol. 74.— P. 1463—1467.
3. Farrell J., Balkow K., Hunt T. et al. // Cell.— 1977.— Vol. 11.— P. 187—200.
4. Hovannesian A. G., Kerr J. M. // Europ. J. Biochem.— 1979.— Vol. 93.— P. 515—526.
5. Laemli U. K. // Nature.— 1970.— Vol. 227.— P. 680—685.
6. Leilig C. E., Coldberg N. D. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1977.— Vol. 74.— P. 1053—1056.
7. Lohmann S. M., Waeter U., Greengard P. // J. biol. Chem.— 1980.— Vol. 255.— P. 9985.
8. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // Ibid.— 1951.— Vol. 193.— P. 265—275.
9. Sieghart W., Forn J., Greengard P. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1979.— Vol. 76.— P. 2475—2479.

Поступила 05.10.88

EFFECT OF HIGH MOLECULAR INDUCTORS OF INTERFERON (dcRNA) ON ADSORPTION OF VIRUS

K. A. Bakunts, M. G. Gevorkyan, E. B. Tazulakhova, R. A. Zakharyan, F. I. Yershov

Institute of Experimental Biology, Academy of Sciences of the Armenian SSR, Yerevan, N. F. Gamaleja Institute of Epidemiology and Microbiology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow.

Interrelationship between phosphorylation of plasmatic membrane proteins in brain cells and the rate of mice encephalomyocarditis virus adsorption was studied. Phosphorylation of proteins induced by dcRNA (Iaryphane) was most distinctly manifested in membrane fraction and cytosole of rat brain neuronal cells. Similarity of molecular mass spectra in dcRNA- and cAMP-dependent phosphorylation enabled to suggest that dcRNA activated protein kinase. An increase in the rate of plasmatic membrane proteins phosphorylation appears to correlate with inhibition of virus adsorption as shown by studies of these reactions dynamics. Under conditions of considerable increase in the rate of membrane proteins phosphorylation adsorption of virus on cells was distinctly inhibited.

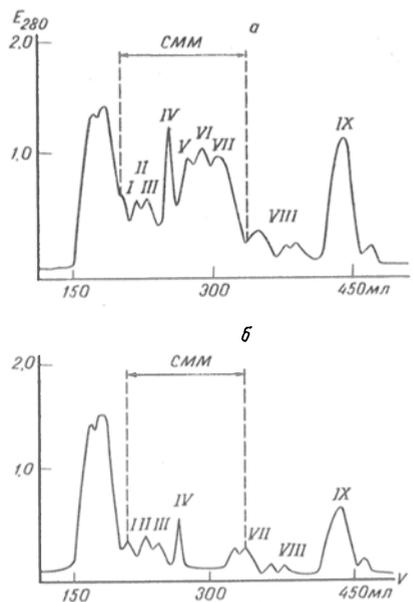


Рис. 1. Пептиды СММ в плазме крови больных с гнойно-септическими заболеваниями (а) и у здоровых небеременных женщин (б).

Здесь и на рис. 2 и 3: колонка (1,5×100 см) с сефадексом G-25, буфер — 0,01 М раствор ацетата натрия, pH 6,7, скорость элюции 12 мл/ч.

300—5000, получившие название «средние молекулы» [6]. Были разработаны способы исследования пептидов средней молекулярной массы (СММ) при почечной недостаточности [3, 4].

Цель настоящего исследования — поиск новых методов диагностики и коррекции эндогенных интоксикаций, обусловленных накоплением в крови пептидов СММ, при септических состояниях в акушерской практике.

Методика

Исследована плазма крови больных с гнойно-септическими заболеваниями акушерской этиологии — метроризидометритами, гнойно-септическими осложнениями после кесарева сечения и др.

Для определения уровня пептидов СММ использованы методы гель-хроматографии и экспресс-метод. Метод гель-хроматографии на колонке с сефадексом G-25 позволяет идентифицировать около 8 фракций пептидов СММ. Для разделения пептидов была использована колонка (1,5×100 см, «Pharmacia», Швеция), заполненная сефадексом G-25. Пептиды элюировали 0,01 М раствором ацетата натрия, pH 6,7; скорость элюции 12 мл/ч. Для анализа пептидов СММ был использован разработанный нами ранее способ [3] со следующей модификацией: надосадочную жидкость после обработки трихлоруксусной кислотой разбавляли не в 3, а в 2 раза. Биологическую активность пептидных фракций определяли на бимолекулярных фосфолипидных мембранах (БФМ), которые получали по методу [5]. Формирование мембран и измерение их электрических характеристик осуществляли, как описано Е. А. Либерманом [1]. Для коррекции эндоген-

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 618.3/7.06:616.94]-07:616.15-008.6-074

Р. И. Степанянц, Ш. Г. Мухамедиева, М. А. Ли, Э. М. Султанова, И. Казаков, Ш. И. Салихов

МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ И КОРРЕКЦИИ ЭНДОГЕННОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ПРИ ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ В АКУШЕРСКОЙ ПРАКТИКЕ

Институт биоорганической химии АН Узбекской ССР, Ташкент

Важную роль в развитии эндогенной интоксикации при патологических состояниях играют эндогенные токсины пептидной природы с мол. м.

Пептиды СММ в крови больных с гнойно-септическими заболеваниями до и после АУФОК

Интоксикация	До сеанса АУФОК	Число сеансов АУФОК												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
Средней тяжести	0,410 ±0,039	0,430 ±0,040	0,380 ±0,037	0,300 ±0,033	0,280 ±0,029	0,260 ±0,031								
Тяжелая	0,720 ±0,041	0,800 ±0,039	0,690 ±0,044	0,600 ±0,038	0,580 ±0,035	0,400 ±0,031	0,370 ±0,030	0,320 ±0,032	0,320 ±0,027					
Крайне тяжелая	0,980 ±0,049	1,100 ±0,054	0,990 ±0,051	0,860 ±0,053	0,800 ±0,050	0,670 ±0,047	0,620 ±0,043	0,570 ±0,038	0,480 ±0,042	0,440 ±0,038	0,380 ±0,037	0,370 ±0,039		

Примечание. Представлены средние арифметические величины (±средние ошибки средних арифметических величин) содержания пептидов СММ (в усл. ед.). Норма — 0,270±0,032.