

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

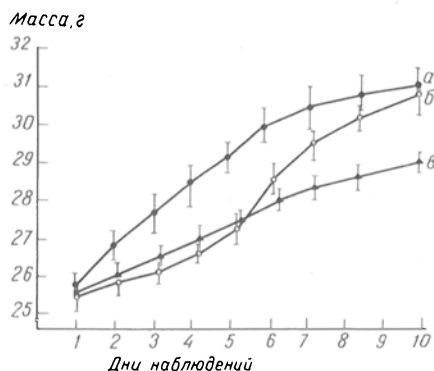
ISSN 0042-8809

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>



Динамика массы тела животных при перевивке АКЭ.

а — 2-я группа, б — 1-я группа, в — 3-я (контрольная) группа.

Однако масса тела животных с АКЭ начинала интенсивно нарастать уже с первых дней после перевивки (см. рисунок) в сравнении с массой тела животных, которым не перевивали опухолевые клетки. Следует отметить, что накануне гибели животных с АКЭ (обычно на 11—13-й день со дня прививки) масса тела животных не увеличивалась или даже снижалась. В случае одновременного введения животным опухолевого материала и препарата гликопротеида отмечалась значительная задержка прироста массы тела животных в первые дни после прививки.

Расчет средней скорости прироста массы тела животных (среднее значение прироста массы тела животных в пересчете на день за первые 6 дней после перевивки опухоли) показал, что скорость прироста массы тела животных 2-й группы почти в 2 раза выше естественного прироста массы тела контрольных животных, а введение препарата гликопротеида одновременно с клетками АКЭ достоверно снижало скорость прироста массы тела подопытных животных приблизительно на 34 % (см. таблицу).

Таким образом, обнаружено, что препарат гликопротеида обладает способностью тормозить развитие АКЭ. Установленное действие гликопротеида может быть связано с обнаруженной ранее его способностью увеличивать продукцию антител (он выступает, вероятно, в роли адьюванта [4]) и, следовательно, увеличивать количество антител в ответ на введение клеток АКЭ, что приводило к торможению развития опухоли.

Действие гликопротеида может быть связано и с его ионофорными свойствами. Так, показано [3], что ингибитор  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -обмена нигерицин, понижая внутриклеточный pH, вызывает подавление синтеза ДНК, т. е. нигерицин выступает как цитостатик. Можно полагать, что цитостатическое действие оказывает и препарат гликопротеида,

влияя на  $\text{Ca}^{2+}$  - и затем pH-регулирующие внутриклеточные системы.

Наблюдение за продолжительностью жизни животных 1-й и 2-й групп показало, что она остается в основном без изменений. Однако у отдельных особей 1-й группы животных продолжительность жизни была несколько выше и общее состояние было лучше, чем у животных 2-й группы. Так, у 1 из 16 животных 1-й группы не развилась АКЭ, а у 4 мышей слабо развилась и произошла ее консолидация. Животные продолжали жить до 37-го дня. Во 2-й группе животных только у 1 из 24 животных произошла консолидация опухоли (уплотнение в области бедра).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Зюсс Р., Кинцель В., Скрибнер Д. Д. Рак: эксперименты и гипотезы: Пер. с англ. — М., 1977. — С. 337—338.
2. Либерман Е. А., Проневич Л. А., Топалы В. П. // Биофизика. — 1970. — Т. 15. — С. 612—618.
3. Марголис Л. Б., Розовская И. А., Скулачев В. П. // Биол. мембраны. — 1986. — Т. 3, № 9. — С. 1148—1151.
4. Миронова Г. Д. Катион-транспортующие белки митохондриальных и плазматических мембран: Дис. ... д-ра биол. наук. — Пушкино, 1985.
5. Миронова Г. Д., Сирота Т. В., Проневич Л. А. и др. // Биофизика. — 1980. — Т. 25, № 2. — С. 276—280.
6. Мусиенко В. С. Экспериментальная регуляция роста отростков нейронов моллюска в культуре: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М., 1982.
7. Сирота Т. В., Сирота Н. П., Миронова Г. Д. // Укр. биохим. журн. — 1987. — Т. 59, № 3. — С. 42—46.
8. Mironova G. D., Sirota T. V., Pronevich L. A. et al. // J. Bioenerg. Biomemb. — 1982. — Vol. 14, N 4. — P. 213—225.
9. Schaffner W. S., Weissmann C. A. // Analyt. Biochem. — 1973. — Vol. 56, N 2. — P. 502—514.

Поступила 16.12.88

## THE INFLUENCE OF MITOCHONDRIAL $\text{Ca}^{2+}$ -TRANSPORTING- $\text{Ca}^{2+}$ -BINDING GLYCOPROTEIN ON DEVELOPMENT OF EHRICH ASCITES TUMOR

T. V. Sirota, Zh. A. Utesheva

Institute of Biological Physics, Academy of Sciences of the USSR, Pushchino.

Single administration of  $\text{Ca}^{2+}$ -transporting- $\text{Ca}^{2+}$ -binding glycoprotein simultaneously with intraperitoneal inoculation of Ehrlich ascites tumor cells into mice led to a decrease in the animals weight growth by approximately 34 % as compared with the animals which were not treated with the glycoprotein. The effect observed was clearly pronounced, especially within the first days after inoculation of Ehrlich ascites tumor. Lifetime of individual experimental animals was increased whereas that of the whole group remained unchanged.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 615.273.55.015.4:612.112.91.074

О. Д. Зинкевич, Н. А. Сафина, А. Ф. Харрасов, А. Х. Мингазова

## ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТОВ ФИБРОНЕКТИНА НА ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ ОТВЕТ НЕЙТРОФИЛОВ

Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии Минздрава РСФСР

В последние годы фибронектин плазмы стал предметом многочисленных экспериментальных и клинических исследований благодаря разнообра-

### Средняя скорость прироста массы тела животных

Группа животных	Средняя скорость прироста массы тела, г/день	Число животных
3-я	$0.41 \pm 0.06$	9
2-я	$0.96 \pm 0.06^*$	24
1-я	$0.63 \pm 0.11^{**}$	16

Примечание. Одна звездочка —  $p < 0.05$  относительно контроля; две —  $p < 0.05$  относительно 2-й группы.

зию своих биологических свойств. Центральное место в этом перечне занимает его опсоническая функция. И хотя в литературе за фибронектином укрепились названия «опсонический гликопротеин», «неиммунный опсонин», «опсонический фибронектин», его роль в реакциях фагоцитоза до сих пор не установлена. В ряде работ показано, что фибронектин, связываясь с различными объектами фагоцитоза, усиливает стадии адгезии и поглощения [4, 5, 7]. Публикации о способности фибронектина стимулировать «метаболический взрыв» фагоцитов противоречивы. По мнению Gudewicz и соавт., при фибронектин-опосредованном фагоцитозе зимозана и желатинизированных микрочастиц индукции «метаболического взрыва» не происходит [6]. В работе Tōgōk и соавт. приводятся данные о способности фибронектина дозозависимо снижать хемилюминесценцию нейтрофилов, стимулированных зимозаном [9]. В ряде других работ отмечено, что фибронектин, связываясь с различными объектами фагоцитоза, способен индуцировать «метаболический взрыв» фагоцитов [8].

В настоящем исследовании мы решили изучить причины таких противоречивых результатов и попытаться найти им объяснение.

## Методика

Способность нейтрофилов к «метаболическому взрыву» оценивали по усилению люминолзависимой хемилюминесценции (ХЛ) с использованием счетчика  $\beta$ -частиц СБС-2 в дифференциальном режиме счета [3].

Нейтрофилы выделяли из свежеполученной крови здоровых доноров, стабилизированной гепарином. После осаждения эритроцитов на декстране Т-500 верхний слой клеток осаждали центрифугированием при 1500 об/мин в течение 15 мин и дважды промывали раствором 1 % альбумина на забуференном фосфатами 0,85 % NaCl pH 7,2—7,4. Конечная концентрация равнялась  $2 \cdot 10^7$  кл/мл. Содержание нейтрофилов составляло 70—80 %, их жизнеспособность, оцененная в тесте с трипановым синим, — 90—95 %.

В качестве объекта фагоцитоза использовали желатинизированные микрочастицы, приготовленные по оригинальному методу [2].

Фибронектин получали из свежей цитратной плазмы здоровых доноров аффинной сорбцией на желатин-целлюлозе. Элюцию фибронектина с сорбента вели 4 М мочевиной с 1 М NaCl. Непосредственно перед использованием элюат фибронектина подвергали диализу против 10 объемов раствора Хенкса. Чистоту всех препаратов фибронектина определяли с помощью электрофореза в ПААГ с ДСД-Na, в перекрестном иммуноэлектрофорезе.

Определение желатинсвязывающей активности проводили по агрегации желатинизированных микрочастиц на лазерном нефелометре оригинальной конструкции.

Концентрацию фибронектина определяли спектрофотометрически при 280 нм в 1 см кювете с использованием коэффициента 12,8.

Свежесыделенный фибронектин подвергали различной степени тепловой денатурации, протеолитической деградации и восстановлению  $\beta$ -меркаптоэтанолом.

Протеолитическую деградацию проводили путем пропускания нативного фибронектина через колонку с трипсином, иммобилизованным на сферической целлюлозе.

Сферическую целлюлозу получали по методу Stamberg в нашей модификации, пересаживая 3 % раствор целлюлозы в 25 % аммиаке в растворе 10 н. HCl [1]. После тщательного отмывания целлюлозу активировали 1 %  $KIO_4$  в течение 1 ч при комнатной температуре. Промытую целлюлозу смешивали с равным объемом 1 % трипсина («Спофа», ЧССР) в забуференном фосфатами физиологическом растворе (ЗФР, pH 7,3) и инкубировали при 4 °C. Через 12—14 ч добавляли трис-HCl pH 8,0, инкубировали 15—20 мин, затем промывали 1 М NaCl pH 8,0, водой, снова 1 М NaCl pH 5,5 под контролем оптической плотности при 280 нм. Готовую трипсин-целлюлозу суспендировали в ЗФР pH 7,3, переносили в колонку объемом 5 мл и медленным током пропускали раствор фибронектина до существенного снижения его биоактивности (менее 5 % от исходной) в тесте агрегации желатинизированных микрочастиц.

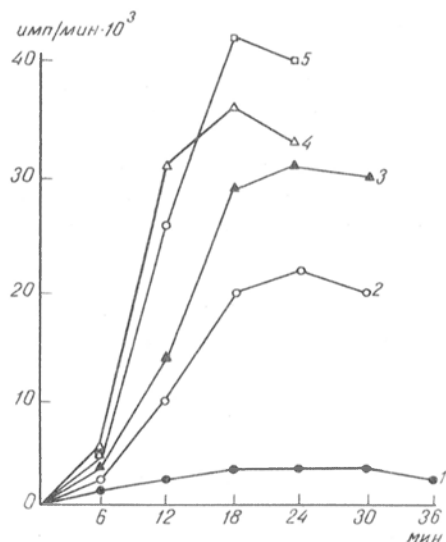


Рис. 1. Дозозависимое влияние нативного фибронектина на ХЛ нейтрофилов человека, стимулированных желатинизированными микрочастицами.

1 — стимуляция нейтрофилов в отсутствие фибронектина; концентрация фибронектина: 2 — 12,5 мкг/мл; 3 — 25 мкг/мл; 4 — 50 мкг/мл; 5 — 100 мкг/мл. Здесь и на рис. 2: по оси абсцисс — время (в мин).

Монопочечный фибронектин получали инкубацией с  $\beta$ -меркаптоэтанолом в течение 1 ч при 37 °C. Затем препарат диализовали против раствора Хенкса.

Тепловую денатурацию фибронектина проводили в двух режимах: при 58 °C 30 мин и в течение 1 ч, а также при 60 °C в течение 1 ч.

При измерении ХЛ нейтрофилов в стандартные флаконы вносили 0,1 мл суспензии нейтрофилов ( $2 \cdot 10^7$  кл/мл), 0,01 мл 1 М раствора люминола в диметилформамиде, 0,1 мл суспензии желатинизированных микрочастиц. Одновременно добавляли препарат фибронектина в концентрации от 12 до 100 мкг/мл. Общий объем доводили до 5 мл раствором Хенкса с 1 % альбумина. Регистрацию ХЛ проводили с интервалом 1 мин до достижения максимального уровня.

## Результаты и обсуждение

Характер влияния фибронектина на люминолзависимую ХЛ нейтрофилов с использованием желатинизированных микрочастиц в качестве объекта фагоцитоза представлен на рис. 1. Контрольная

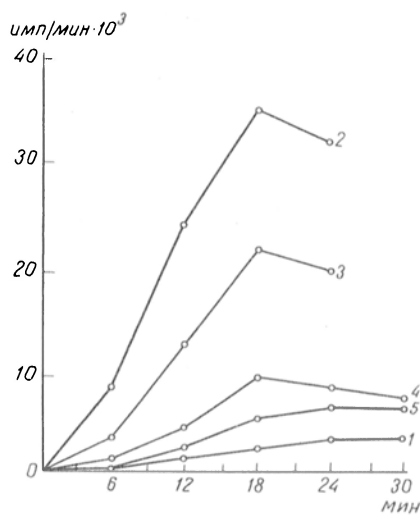


Рис. 2. Влияние денатурированного теплом фибронектина на ХЛ нейтрофилов.

1 — без фибронектина; 2 — нативный фибронектин; денатурированный фибронектин: 3 — 58 °C, 0,5 ч; 4 — 58 °C, 1 ч; 5 — 60 °C, 1 ч.

кривая характеризует стимуляцию нейтрофилов микрочастицами в отсутствие опсонина. Добавление в суспензию фибронектина в концентрациях от 12 до 50 мкг/мл вызывает значительное усиление ХЛ (более чем в 4 раза) по сравнению с контролем. Хотя абсолютные значения максимальной ХЛ и время его достижения варьировали из опыта в опыт (ответ нейтрофилов, по-видимому, зависит от их состояния), характер зависимости сохраняется.

Влияние препаратов фибронектина, денатурированных теплом, на ХЛ нейтрофилов представлено на рис. 2. Как видно, при тепловой денатурации происходит снижение степени активации нейтрофилов в тесте люминолзависимой ХЛ. Кроме того, препараты фибронектина, прогретые при 58 °С 30 и 60 мин, снижают способность агрегировать желатинизированные микрочастицы до 30 и 13 % по сравнению с нативным препаратом. Препарат фибронектина, прогретый при 60 °С в течение 1 ч, проявляет желатинагрегирующую активность менее 3 % по сравнению с нативным препаратом. В тесте люминолзависимой ХЛ этот препарат оказывает незначительное влияние на стимуляцию ХЛ, близкую к таковой в контроле.

Препарат фибронектина, инкубированный с трипсин-целлюлозой, проявляет нулевую желатинагрегирующую активность и не влияет на люминолзависимую ХЛ нейтрофилов.

Препарат фибронектина, восстановленный β-меркаптоэтанолом, также не проявляет активности в тесте агрегации желатинизированных микрочастиц и не влияет на люминолзависимую ХЛ.

Таким образом, из полученных нами результатов следует, что влияние фибронектина на ХЛ нейтрофилов зависит от сохранения нативности его молекулы, о чем свидетельствуют данные о желатинсвязывающей способности.

Очевидно, как целая молекула фибронектина, так и ее фрагменты, содержащие неразрушенные домены, способны связываться с одноименными рецепторами на клетках. Однако для активации клеток необходимо сохранение нативной структуры фибронектина.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Аффинная хроматография: Методы: Пер. с англ.— М., 1988.
2. Зинкевич О. Д., Литвинов Р. И., Куравская М. С., Мухомидинова Р. Г. // Способ определения концентрации фибронектина в растворе. А. с. 984305 СССР.
3. Сафина Н. А., Середкин С. М., Харрасов А. Ф., Зинкевич О. Д. // Инфекционная аллергия и иммунитет.— Казань, 1986.— С. 110—113.
4. Douglas D., Grinell F. // Cell Biol.— 1983.— Vol. 97, N 5.— P. 1515—1523.
5. Gudevicz P. W., Molnar J., Lai M. Z. et al. // Ibid.— 1980.— Vol. 87, N 2.— P. 427—433.
6. Gudevicz P. W., Beezhold D. H., Van Allen P., Molnar J. // Res. J. Reticuloendoth. Soc.— 1982.— Vol. 32, N 2.— P. 143—154.
7. Jauperaa T., Johnson E. // Scand. J. Immunol.— 1984.— Vol. 20, N 1.— P. 35—42.
8. Proctor R. A., Prendengast E., Mosher D. F. // Blood.— 1982.— Vol. 59, N 4.— P. 681—687.
9. Török J., Marlicsek J., Cseh K. et al. // Ann. Immunol. hung.— 1986.— Vol. 26, N 2.— P. 679—685.

Поступила 17.02.89

## EFFECT OF FIBRONECTIN ON CHEMILUMINESCENCE OF NEUTROPHILS

O. D. Zinkevich, N. A. Saphina, A. F. Kharrasov, A. Ch. Myneazova

Laboratory of Immunology and Biochemistry, Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan.

Effect of some fibronectin preparations on luminol-dependent chemiluminescence of neutrophils was studied. These fibronectin preparations were obtained after heat denaturation and tryptic digestion. Native fibronectin cause aggregation of gelatin-coated particles and dose-dependent promotion of chemiluminescence of neutrophils, while the rate of these reactions was distinctly decreased if the heat denaturated preparations of fibronectin were used. Structural integrity of fibronectin molecule appears to be responsible for promotion of the neutrophil chemiluminescence.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 612.173.1.015.31:546.411.014.49:613.863

Ф. З. Меерсон, Т. Г. Сазонтова, Ю. В. Архипенко

## АДАПТАЦИЯ К КРАТКОВРЕМЕННЫМ СТРЕССОРНЫМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ УВЕЛИЧИВАЕТ АКТИВНОСТЬ КАЛЬЦИЕВОГО НАСОСА САРКОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА И СНИЖАЕТ СКОРОСТЬ ЕГО ИНАКТИВАЦИИ ПРИ АВТОЛИЗЕ

НИИ общей патологии и патологической физиологии АМН СССР, Москва

Известно, что интенсивный и длительный стресс вызывает снижение порога фибрилляции сердца [12], постстрессорную ригидность миокарда [3] и увеличивает зависимость функции изолированного сердца от концентрации  $Ca^{2+}$  в перфузате [25]. Одновременно происходит снижение активности Са-АТФазы саркоплазматического ретикулума (СПР) [11], а при цитологическом исследовании выявляется избыток  $Ca^{2+}$  в саркоплазме кардиомиоцитов [22]. Этот комплекс сдвигов свидетельствует о нарушении кальциевого гомеостаза кардиомиоцитов при стрессорном повреждении и может быть предупрежден с помощью предварительной адаптации к повторным кратковременным стрессорным воздействиям [10]. В последние годы выяснилось, что такая адаптация предупреждает также снижение порога фибрилляции сердца, его эктопическую активность и депрессию сократительной функции при остром инфаркте миокарда [14], постинфарктном кардиосклерозе [13] и значительно ограничивает аритмии при острой ишемии и реперфузии сердца [10]. Существенно, что этот последний антиаритмический эффект наблюдается не только в условиях целостного организма, но сохраняется при воспроизведении ишемии и последующей реперфузии на изолированном сердце адаптированных животных [17]. Установлено также, что при определенных условиях адаптация к коротким стрессорным неповреждающим эффектам ограничивает аритмогенное и контрактурное действие избыточного содержания кальция на изолированное сердце [18].

Таким образом, в результате адаптации к кратковременным стрессорным воздействиям наряду с активацией центральных стресс-лимитирующих систем [20, 44], на уровне самого сердца формируется какой-то защитный механизм, обладающий