

УДК 535.37:576.344:612.112.94

©Коллектив авторов

БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИЙ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ СУБСТРАТОВ И КОФАКТОРОВ В ЛИМФОЦИТАХ

Е.Ю. Фоменко¹, Е.В. Слепов², Е.В. Инжесваткин³, А.А. Савченко²

¹Кафедра биохимии и физиологии человека и животных Красноярского государственного университета, г. Красноярск, пр. Свободный, 79;

²Лаборатория молекулярно-клеточной физиологии и патологии Института медицинских проблем Севера СО РАМН, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 3г; факс: (3912) 23-19-63; эл. почта: rsimprn@scn.ru

³Международный научный центр исследований экстремальных состояний организма при Президиуме Красноярского научного центра СО РАН, г. Красноярск, Академгородок; факс: (3912) 49-53-78; эл. почта: inscience@mail.ru

Разработана новая методика биолюминесцентного определения концентраций пирувата, лактата, малата, глутамата и NAD⁺ в лимфоцитах периферической крови мышей с асцитной карциномой Эрлиха. Обнаружены колебания изучаемых параметров в зависимости от стадии роста опухоли. К терминальной стадии роста нами обнаружена интенсификация протеолиза и снижение анаэробного дыхания в лимфоцитах крови мышей.

Ключевые слова: лимфоциты, пируват, лактат, малат, NAD⁺, биолюминесцентный анализ.

ВВЕДЕНИЕ. Определение концентраций метаболитических субстратов и кофакторов может дать важную информацию о характере биохимических процессов в клетках. Поскольку концентрации субстратов в клетках, как правило, невелики, важным требованием к методике их определения является специфичность и достаточная чувствительность. Этому требованию в полной мере отвечает биолюминесцентный метод [1- 3].

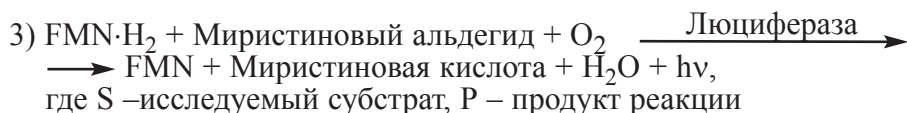
Цель данной работы - разработка биолюминесцентного метода определения концентраций пирувата, лактата, малата, глутамата и NAD⁺ в лимфоцитах периферической крови.

МЕТОДИКА. В работе использовали мышей ICR с массой тела 20–25 г в возрасте 2–2,5 мес., содержащихся в стандартных условиях вивария. Кровь брали у животных, предварительно усыпленных эфиром, из подключичной артерии.

Лимфоциты выделяли в градиенте плотности ($\rho=1,083$ г/мл) фикокол-верографина [4] и отмывали путем центрифугирования в 0,9% растворе NaCl. Суспензию выделенных лимфоцитов, содержащую клетки в концентрации 1,0 млн/мл, после однократного замораживания-размораживания дополнительно разрушали путем осмотического лизиса (с добавлением дистиллированной воды).

Концентрации субстратов определяли с использованием сопряженной биолюминесцентной системы, которая включала следующие реакции:

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУБСТРАТОВ И КОФАКТОРОВ В ЛИМФОЦИТАХ



При этом важным было выявление оптимальных концентраций кофакторов для исследования концентраций соответствующих субстратов. Для реакций, в которых в качестве исследуемого субстрата служили малат, глутамат и лактат, исследование осуществляли следующим образом: 100 мкл суспензии разрушенных лимфоцитов вносили в 100 мкл инкубационного раствора, который содержал соответствующий фермент - малатдегидрогеназу (МДГ; “ICN”, США), глутаматдегидрогеназу (ГДГ; “Fluka AG”, Германия) или лактатдегидрогеназу (ЛДГ; “ICN”) с уровнем активности 1,0 мкЕ. Инкубационный раствор содержал также NAD^+ (AppliChem GmbH, “BioChemica”, Германия) в концентрации от $1,0 \times 10^{-5}$ до $7,5 \times 10^{-3}$ М. Для реакции, в которой в качестве исследуемого субстрата выступал пируват, а в качестве кофактора NADH (AppliChem GmbH, “BioChemica”), 100 мкл суспензии разрушенных лимфоцитов вносили в 100 мкл инкубационного раствора, который содержал ЛДГ с уровнем активности 1,0 мкЕ и NADH в диапазоне концентраций от $1,0 \times 10^{-5}$ до $1,0 \times 10^{-9}$ М. В том случае, когда исследуемым субстратом являлся NADH, а кофактором для его определения выступал лактат, концентрацию последнего варьировали в диапазоне от $1,0 \times 10^{-5}$ до $7,5 \times 10^{-3}$ М (фермент – ЛДГ).

Далее полученные реакционные пробы инкубировали при $+37^\circ\text{C}$ в течение 30 минут для ферментативных реакций с восстановлением NAD^+ или 15 минут для реакции с окислением NADH. После чего добавляли 300 мкл 0,1 М K^+, Na^+ -фосфатного буфера (pH 7,0), 100 мкл раствора, содержащего FMN (“Sigma”, США) в концентрации $1,5 \times 10^{-5}$ М и альдегид (тетрадеканаль) в концентрации 0,0005%, после чего вносили 50 мкл ферментативной системы NAD(P)H:FMN оксидоредуктаза-люцифераза (все реактивы биOLUMиНесцентной системы разведены в 0,1 М K^+, Na^+ -фосфатном буфере pH 7,0; система разработана и производится НИИ биофизики КНЦ СО РАН, г. Красноярск). Максимум интенсивности биOLUMиНесценции определяли с использованием Биохемилуминометра 3606М, сконструированном в СКТБ “Наука” Красноярского научного центра СО РАН. При помощи калибровочной кривой определяли концентрацию NADH в пробе.

В результате были найдены оптимальные значения концентраций кофакторов для определения содержания пирувата, лактата, малата, глутамата и NAD^+ в лимфоцитах (табл. 1).

Таблица 1. Оптимальные концентрации кофакторов для определения содержания пирувата, лактата, малата, глутамата и NAD^+ в лимфоцитах.

Субстрат	Пируват	Лактат	Малат	Глутамат	NAD^+
Кофактор	NADH	NAD^+	NAD^+	NAD^+	Лактат
Оптимум концентрации кофактора, М	5×10^{-4}	5×10^{-4}	$2,5 \times 10^{-3}$	$2,5 \times 10^{-3}$	5×10^{-4}

При данных дегидрогеназных реакциях превращение одной молекулы субстрата соответствует превращению одной молекулы кофактора. Таким образом, количество NADH в пробе отражает концентрацию исследуемого субстрата. Учитывая, что в клетках имеется определенное эндогенное количество других ферментов, определялись показатели, условно названные “фоном”. Определение “фонов” проводили в тех же условиях, но в инкубационную смесь вместо соответствующего фермента вносили буфер. Таким образом, искомое содержание субстрата вычисляли как разницу между результатом, полученным с использованием соответствующего фермента, и “фоном”.

Инокуляцию опухолевых клеток в брюшную полость животных осуществляли в количестве 3×10^6 клеток на одно животное в 0,2 мл физиологического раствора. Перед инокуляцией клетки трижды отмывали в физиологическом растворе от асцитной жидкости животного-донора путём центрифугирования. Забор крови и лимфоцитов осуществляли на 5, 7, 9, 11, 13 и 15 дни после инокуляции опухоли, считая день прививки первым днем роста опухоли, при этом к 15 дню смертность мышей составляла 20%. Параллельно брали кровь у интактных животных, которые составляли контрольную группу. Всего было использовано 160 животных.

Проверку гипотезы о статистической достоверности различия выборок проводили с помощью критерия Манна-Уитни [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Полученные данные представлены в таблице 2.

Таблица 2. Концентрации исследованных метаболитов (нмоль/мг белка) в лимфоцитах мышей с асцитной карциномой Эрлиха в динамике роста опухоли.

Субстрат	интактные животные (n=24) 1	День развития опухоли					
		5 день (n=20) 2	7 день (n=20) 3	9 день (n=20) 4	11 день (n=20) 5	13 день (n=20) 6	15 день (n=20) 7
Лактат	520,67± 170,76	496,51± 127,15	316,28± 124,33 $P_{1,2} < 0,05$	569,10± 169,96 $P_3 < 0,05$	560,31± 189,16	378,97± 96,16 $P_3 < 0,05$	208,00± 72,19 $P_7 < 0,05$
Пировуат	21,80± 6,71	53,71± 14,89 $P_1 < 0,05$	25,49± 7,93	33,31± 9,80	157,590± 38,01 $P_{1,3} < 0,001$ $P_{2,4} < 0,01$	52,50± 11,50 $P_1 < 0,01$ $P_{3,5} < 0,05$	34,85± 12,49 $P_5 < 0,01$
NAD ⁺	1,08±0,38	1,31±0,46	2,04±0,56 $P_{1,2} < 0,05$	1,79±0,57 $P_1 < 0,05$	1,57±0,41 $P_{1,2} < 0,05$	1,90±0,5 0 $P_1 < 0,05$	2,34±0,75 $P_{1,2} < 0,05$
Малат	69,17± 29,34	163,25± 80,93	20,16± 14,28	755,49± 264,96 $P_1 < 0,01$	0,01± 0,001 $P_1 < 0,01$	360,18± 130,36 $P_1 < 0,05$	603,33± 338,58 $P_1 < 0,05$
Глутамат	17331± 3202	31012± 1746 $P_1 < 0,01$	26043± 2482 $P_1 < 0,05$	30171± 2736 $P_1 < 0,01$	30213± 2281 $P_1 < 0,01$	28808± 2201 $P_1 < 0,01$	26932± 3533 $P_1 < 0,05$

Содержание пирувата достигает своего максимального значения на 11 день развития опухоли. Однако в терминальной стадии (13-15 дни) концентрации пирувата и лактата значительно снижаются.

Наряду с этим, в ходе наших исследований отмечено постепенное возрастание содержания NAD⁺ в лимфоцитах что, возможно, косвенно свидетельствует о нарушении окислительно-восстановительного баланса в клетках. При этом на 9 и 15 дни роста опухоли в лимфоцитах возрастает содержание малата, одного из промежуточных продуктов цикла трикарбоновых кислот.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУБСТРАТОВ И КОФАКТОРОВ В ЛИМФОЦИТАХ

К началу фазы “логарифмического роста” нами обнаружено увеличение содержания глутамата. Однако после 7 дня развития опухоли этот показатель остается на постоянном уровне вплоть до 15 дня.

Таким образом, разработанная нами методика билюминесцентного определения концентраций субстратов в лимфоцитах дает возможность исследовать метаболические изменения в этих клетках, связанные, в частности, с развитием опухоли в организме животных.

Кроме того, разработанный метод позволяет проводить исследование концентраций перечисленных субстратов и в условиях клинко-диагностической лаборатории. От существующих методов он выгодно отличается анализом в микрообъеме, что позволяет уменьшить количество забираемого у обследуемого биоматериала (крови).

Работа выполнена при поддержке Красноярского краевого фонда науки (гранты 12F986С, 13G068, 14G088).

ЛИТЕРАТУРА

1. Савченко А.А. (1991) Лаб. дело, №11, 22-25.
2. Савченко А.А., Сунцова Л.Н. (1989) Лаб. дело, №11, 23-25.
3. Угарова Н.Н., Бровко Л.Ю., Кутузова Г.Д. (1993) Биохимия, **58**, 1351-1373.
4. Воуит А. (1968) Scand. J. Clin. Lab. Invest., **21** (Suppl. 97), 77-80.
5. Лакин Г.Ф. (1990) Биометрия, М.: Высшая школа. 351 с.

Поступила: 16. 02. 2005.

BIOLUMINESCENT METHOD FOR DETERMINATION OF CONCENTRATION METABOLIC SUBSTRATES AND NAD⁺ IN THE LYMPHOCYTES

E.J. Fomenko¹, E.V. Slepov², E.V. Inzhevatin³, A.A. Savchenko²

¹Department of Human and Animal Biochemistry and Physiology, Krasnoyarsk State University, , pr. Svobodnyi, 79, Krasnoyarsk, Russia;

²Laboratory of Cell and Molecular Physiology and Pathology, Scientific Research Institute of Medical Problems of North, Siberian Division of Russian Academy of Medical Sciences, ul. Partizana Zheleznyaka, 3g, Krasnoyarsk, Russia;

³International Scientific Center for Organism Extreme State Research attached to Presidium of Krasnoyarsk Scientific Center, Siberian Division of Russian Academy of Sciences, Akademgorodok, 50, Krasnoyarsk, Russia; e-mail: inscience@mail.ru

We have developed a new bioluminescent method for determination of concentrations of pyruvate, lactate, malate, glutamate and NAD⁺ in the periferal blood lymphocytes from mice with Ehrlich ascites carcinoma. There were blood samples of intact mice for control. We found that variations of these substrates, depend on stage of malignant growth.

Key words: lymphocytes, pyruvate, lactate, malate, glutamate, NAD⁺, bioluminescent approach.